

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA



INSTITUTO CLODOMIRO PICADO UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA A PARTIR DE PLASMA EQUINO

**Informe de trabajo final de graduación para optar por el grado de
Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

Mariángela Vargas Arroyo

Cartago Setiembre, 2006

RESUMEN

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA A PARTIR DE PLASMA EQUINO

Mariángela Vargas Arroyo*

La principal actividad del Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica, es la producción de suero antiofídico para el tratamiento de personas que han sufrido mordeduras de serpientes. El suero se obtiene mediante el fraccionamiento de plasma para purificar la fracción de las inmunoglobulinas. En dicho proceso se deshecha la albúmina, una proteína plasmática de gran utilidad, tanto a nivel terapéutico como a nivel de reactivo de laboratorio. Con el fin de recuperar y aprovechar esta proteína, en el presente trabajo se evaluaron varias metodologías para la purificación de albúmina a partir de plasma equino. Las metodologías empleadas fueron el fraccionamiento alcohólico en frío, la termocoagulación selectiva con etanol y con polietilenglicol, y la cromatografía de intercambio iónico. Luego de evaluar el rendimiento y la pureza de las muestras obtenidas por cada método, se concluyó que la termocoagulación selectiva es más efectiva que el fraccionamiento alcohólico en frío, y que la cromatografía de intercambio iónico es una técnica útil como etapa final del proceso de purificación de la albúmina. Los resultados obtenidos en esta investigación, sirven de referencia para futuros trabajos relacionados con el desarrollo de un producto a partir de plasma equino o humano, que cumpla con las especificaciones internacionales y que sea útil para la sociedad.

Palabras claves: albúmina, fraccionamiento alcohólico en frío, termocoagulación selectiva, cromatografía de intercambio iónico, pureza, rendimiento.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

ABSTRACT

IMPLEMENTATION OF A METHOD FOR THE PURIFICATION OF ALBUMIN FROM EQUINE PLASMA

Mariángela Vargas Arroyo*

The main activity of the Instituto Clodomiro Picado from the Universidad de Costa Rica is the production of antiofidic serum for the treatment of persons who had suffered snake bites. The serum is obtained by fractionation of plasma to purify the fraction of the immunoglobulins. In this process the albumin, a plasmatic protein of great value at therapeutic and laboratory reactive levels, is dismissed. In the present work, several methodologies were tested for the purification of albumin from equine plasma, with the finality of recovering and exploiting such protein. The methodologies employed were the cold ethanol fractionation, the selective thermocoagulation with ethanol and polyetilenglicol, and the ion exchange chromatography. After evaluating the yield and purity of the samples obtained from each method, it was concluded that the selective thermocoagulation is more effective than cold ethanol fractionation, and that the ion exchange chromatography is a very useful technique as a final fase of the process of albumin purification. The results obtained in this research are a reference for future works related with the development of a product obtained from equine or human plasma, which obey the international standards and be useful for the society.

Key words: albumin, cold ethanol fractionation, selective thermocoagulation, ion exchange chromatography, purity, yield.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

ACREDITACION

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA A PARTIR DE PLASMA EQUINO

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Bach. Eric Hernández
Profesor Asesor- ITCR**

**Bach. Álvaro Segura Ruiz
Asesor- Instituto Clodomiro Picado**

**MSc. Guillermo León Montero
Lector**

DEDICATORIA

A mi sobrino Tomás.

Mariángela

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Caro y Jorge, les agradezco profundamente por su apoyo incondicional, por su confianza, por creer tanto en mí y por ser además de una gran familia, cuatro amigos excepcionales.

Álvaro, infinitas gracias por su guía, interés, dedicación, amistad y por su enorme ayuda durante la ejecución del trabajo.

A Memo, María y Fabricio, les agradezco por todos sus consejos, por su constante disposición a ayudarme y por su valioso aporte de conocimiento a este trabajo.

A Erick Hernández, muchísimas gracias por su orientación, consejos y colaboración durante este proceso.

A los compañeros de producción del ICP, Eduardo, Alfredo, Cristián y Mikel, les agradezco por su cooperación y cariño, y por siempre estar dispuestos a ayudarme.

A los demás compañeros del ICP, especialmente a Bruno Lomonte, les agradezco por su colaboración y por el interés mostrado en el trabajo.

Lucho, demasiadas gracias por su compañía, ayuda, amistad y apoyo incondicional.

A mis amigas y amigos, especialmente a Mich, ¡mil gracias por todo!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ACREDITACION.....	4
DEDICATORIA.....	5
AGRADECIMIENTOS.....	6
ÍNDICE GENERAL.....	7
ÍNDICE DE CUADROS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE ANEXOS.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
REVISIÓN DE LITERATURA.....	15
Albúmina: generalidades.....	15
Fraccionamiento del plasma para la obtención de albúmina.....	17
Utilización de la albúmina: funciones y especificaciones	21
Nuevas alternativas para la obtención de albúmina	24
Técnicas empleadas para la evaluación del rendimiento y el grado de pureza de la albúmina	27
OBJETIVOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Adquisición de las muestras de plasma	32
Purificación de albúmina	32
Fraccionamiento alcohólico en frío.....	33
Termocoagulación selectiva	35
Cromatografía de intercambio iónico.....	39
Evaluación del rendimiento y pureza de albúmina en las muestras obtenidas...	41
Diseño de un procedimiento para la purificación de albúmina	44
RESULTADOS.....	45
Proceso de purificación de albúmina.....	45
Resultados de pureza y rendimiento	46
Fraccionamiento alcohólico en frío.....	46

Termocoagulación selectiva	51
Cromatografía de intercambio iónico.....	57
Diseño de un procedimiento para la purificación de albúmina	62
DISCUSIÓN.....	63
Fraccionamiento alcohólico en frío.....	64
Termocoagulación selectiva	67
Etanol	68
Polietilenglicol (PEG).....	71
Cromatografía de intercambio iónico.....	72
Diseño de un procedimiento para la purificación de albúmina	74
CONCLUSIONES.....	76
RECOMENDACIONES.. ..	78
BIBLIOGRAFIA.....	79
ANEXOS.....	84

ÍNDICE DE CUADROS

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Especificaciones establecidas por la EP (European Pharmacopeia) para la comercialización de albúmina humana con fines terapéuticos	24
2	Resultados del rendimiento y pureza obtenidos en muestras finales de albúmina mediante fraccionamiento alcohólico en frío	50
3	Resultados del rendimiento y pureza obtenidos en muestras finales de albúmina mediante termocoagulación con etanol	54
4	Resultados del rendimiento y pureza obtenido en muestra finales de albúmina mediante termocoagulación con polietilenglicol (PEG)	56
5	Comparación del porcentaje de pureza de muestras finales de albúmina antes y después de la cromatografía de intercambio iónico	59

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Estructura tridimensional de la albúmina determinada por cristalografía de rayos X	16
2	Esquema de fraccionamiento de plasma según método de Cohn y método de Kistler y Nitshmann	19
3	Esquema del método de Cohn modificado empleado para realizar el fraccionamiento alcohólico en frío para la obtención de albúmina	33
4	Esquema del método inicial de termocoagulación selectiva con etanol empleado para la obtención de albúmina	36
5	Esquema del método final de termocoagulación selectiva con etanol empleado para la obtención de albúmina	38
6	Esquema del de termocoagulación selectiva con polietilenglicol (PEG) empleado para la obtención de albúmina	39
7	Imágenes de las diferentes etapas de la purificación de albúmina mediante fraccionamiento alcohólico en frío (A) y termocoagulación con PEG (B).	45
8	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío con diferentes concentraciones de etanol.	47
9	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío a diferentes temperaturas.	48
10	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío con diferentes valores de pH y tiempos de incubación luego de bajar el pH.	49

11	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con etanol	51
12	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con etanol	52
13	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con etanol	53
14	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con polietilenglicol	56
15	Cromatogramas de la absorbancia a 280 nm de la cromatografía de intercambio aniónico de plasma hiperinmune	57
16	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico sin tratamiento previo del plasma	58
17	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de cromatografía de intercambio iónico de muestras finales de albúmina	59
18	Cromatogramas de cromatografía de fase reversa en HPLC de muestras finales de albúmina obtenidas mediante diferentes métodos de fraccionamiento	61
19	Esquema del proceso para la purificación de albúmina con la combinación de las técnicas evaluadas	62

ÍNDICE DE ANEXOS

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Determinación de cloruros con nitrato de plata	84
2	Preparación del reactivo de Biuret	85
3	Preparación de soluciones para electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cantidades requeridas	86
4	Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío mediante centrifugación y filtración	88
5	Cromatogramas de la absorbancia a 280 nm de cromatografía de intercambio aniónico de muestras finales de albúmina obtenidas mediante diferentes métodos de fraccionamiento	89
6	Cromatogramas de cromatografía de fase reversa en HPLC de plasma y productos comerciales de albúmina	90

INTRODUCCIÓN

El plasma sanguíneo, que corresponde a la porción líquida de la sangre excluyendo a las células, es considerado como una materia prima biológica de gran complejidad. Posee más de cien proteínas, las cuales se encuentran en diversas concentraciones y presentan funciones fisiológicas diferentes. Las proteínas plasmáticas que se encuentran en mayor proporción son la albúmina (60%), la inmunoglobulina G (IgG) (12%) y el fibrinógeno (4%) (Burnouf, 1995; Madigan *et al.*, 1999).

Tal como ha ocurrido con otras invenciones, el fraccionamiento del plasma nació producto de una necesidad militar en la década de los cuarentas para producir albúmina como expansora del volumen de la sangre en circulación, de manera que pudiese ser usada bajo condiciones de batalla. Para esto, Estados Unidos implementó un programa a cargo de Edwin Cohn para que desarrollara dicho producto en grandes cantidades. A partir del trabajo pionero realizado por Cohn y sus colaboradores, en el cual se logró la separación del plasma en diferentes fracciones definidas, se establecieron los principios básicos en los cuales la tecnología de fraccionamiento moderno aún se fundamenta (More y Harvey, 1991).

El objetivo primordial de dicho fraccionamiento es el de proveer a la sociedad productos de valor terapéutico seguros y efectivos, al menor costo posible. Dentro de éstos, los productos tradicionales son la albúmina, la inmunoglobulina G y los factores de coagulación (FVIII y FIX). No obstante, también se le ha dado importancia a otras proteínas plasmáticas de uso terapéutico como la antitrombina III, la fibronectina, el fibrinógeno, las proteínas S y C y el plasminógeno, entre otras (More y Harvey, 1991).

En nuestro país, el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Costa Rica tiene como actividad principal la producción de suero para el tratamiento del

accidente ofídico, es decir el envenenamiento por mordeduras de serpientes. El suero antiofídico se produce mediante el fraccionamiento de plasma equino hiperinmune (proveniente de caballos que fueron inmunizados con veneno de serpiente) mediante la precipitación con ácido caprílico, con el fin de purificar la fracción de las inmunoglobulinas (Rojas *et al.*, 1994). Dentro de las proteínas plasmáticas que son desechadas en el proceso productivo de este suero, se encuentra la albúmina. Dicha proteína se produce y comercializa desde hace más de 50 años como parte de una biotecnología que permite aprovechar una proteína plasmática, ya sea de fuente humana o de otro animal. En el caso de la albúmina humana, esta es la proteína sérica más utilizada en el mundo. Se estima que las necesidades mundiales de reserva se sitúan en aproximadamente 500 toneladas por año, cifra que representa en el mercado un valor de 1,5 billones de dólares (Daniell, 2003). Por tanto, la albúmina puede ser aplicada en el campo de la medicina con fines terapéuticos y como reactivo de laboratorio.

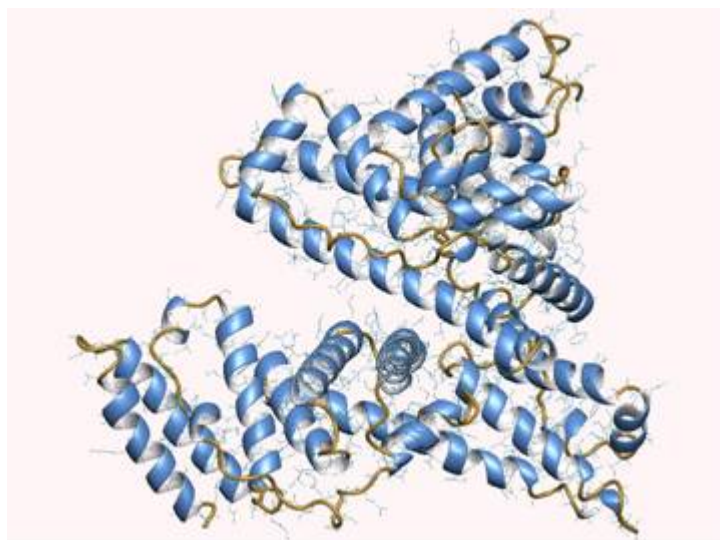
El fin del presente trabajo es el de purificar albúmina a partir de plasma equino mediante el uso de técnicas de fraccionamiento ya establecidas. Esto constituiría una primera fase que permita en un futuro la generación de un producto que cumpla con las especificaciones y requisitos internacionales, el cual pueda ser utilizado en el campo veterinario en el tratamiento de caballos, y que además satisfaga las necesidades de esta proteína dentro del Instituto Clodomiro Picado (laboratorios y caballeriza).

REVISIÓN DE LITERATURA

Albúmina: generalidades

Debido a sus características y funcionalidad, la albúmina ocupa una posición esencial entre las proteínas plasmáticas. Es la proteína de mayor concentración en el plasma; en condiciones normales, la concentración de proteínas totales del plasma varía entre 6,2 y 7,9 g/dl, siendo la concentración de albúmina entre 3,6 y 5,2 g/dl. Su estructura y propiedades físicas están bien establecidas. Es una proteína globular y monomérica, de cadena sencilla constituida por 585 aminoácidos no glicosilados, que posee un peso molecular de 66 500 Dalton; contiene 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula, que le confieren cierta estabilidad. (IVIC, 2005; More y Harvey, 1991).

Minghetti y colaboradores (1986) encontraron que el gen de la albúmina, el cual se ubica en el brazo largo del cromosoma cuatro (4 q13 – q11), posee 16961 nucleótidos y 15 exones, estos últimos se encuentran ubicados simétricamente dentro de tres dominios homólogos. Se cree que estos dominios surgieron producto de una triplicación de un único primer dominio. Cada uno contiene de cinco a seis puentes disulfuro y es producto de dos subdominios que poseen motivos estructurales en común. Las principales regiones de unión de ligandos a esta proteína están ubicados en cavidades hidrofóbicas en los subdominios IIA y IIIA (HPRD, 2006). (Ver figura 1)



Fuente: Protein Data Bank

Figura 1. Estructura tridimensional de la albúmina determinada por cristalografía de rayos X

Esta proteína ostenta rasgos esenciales que la diferencian de las demás proteínas del plasma y que están estrechamente relacionados con su purificación: tiene una carga negativa alta a pH fisiológico, su punto isoeléctrico es el más bajo y es extremadamente soluble en soluciones acuosas de hasta 35% w/v. Asimismo, es notablemente estable a temperaturas hasta de 70° C (IVIC, 2005; Moya *et al.*, 2000; More y Harvey, 1991).

Con respecto a la fisiología de la albúmina, ésta representa aproximadamente el 10% de la actividad de síntesis proteica del hígado, produciéndose de 9 a 12 gramos por día. En este órgano es sintetizada en forma de preproalbúmina, la cual tiene un péptido N-terminal que es removido antes de que la proteína naciente sea liberada por el retículo endoplasmático rugoso. El producto, denominado proalbúmina, es separado en las vesículas del aparato de Golgi para dar paso a la albúmina que se secreta (OMIM, 2006).

Entre sus funciones se encuentra el transporte de muchas moléculas pequeñas en la sangre, ya sea endógenas o exógenas, como bilirrubina, iones metálicos, calcio, hormonas (cortisol, sexuales, entre otras), enzimas, ácidos grasos libres,

toxinas y drogas. Dicho transporte se debe a la alta afinidad, generalmente de tipo hidrofóbico, que se da entre la albúmina y dichas moléculas. Sin embargo, bajo las condiciones adecuadas, la tasa de disociación entre éstas, puede ser elevada (Budnick y Fitzgerald, 2003). La albúmina también es de vital importancia para el mantenimiento del 80% de la presión oncótica de la sangre (evita la fuga de líquidos a los tejidos). Esto se debe a que, a diferencia de las moléculas pequeñas como el sodio y el cloro, la concentración de albúmina en la sangre es mucho mayor que en el líquido extracelular (University of Maryland Medical Center, 2004; Matejtschuk *et al.*, 2000). Cabe aclarar que se denomina presión oncótica o presión coloidosmótica al efecto osmótico conjunto de las proteínas, que es el resultado de: la presión osmótica (que sólo depende del número de partículas), la presión provocada por el agua de hidratación y la presión provocada por la presencia de iones (González, 1998).

Asimismo, la albúmina posee otras funciones como: genera un balance ácido-base, captura radicales libres al unirlos a sus grupos sulfhidrilo, tiene efecto antioxidante y anticoagulante (inhibe la agregación de plaquetas, aumenta la inhibición del factor Xa por parte de la antitrombina III) y afecta la permeabilidad vascular (Negligan, 2001).

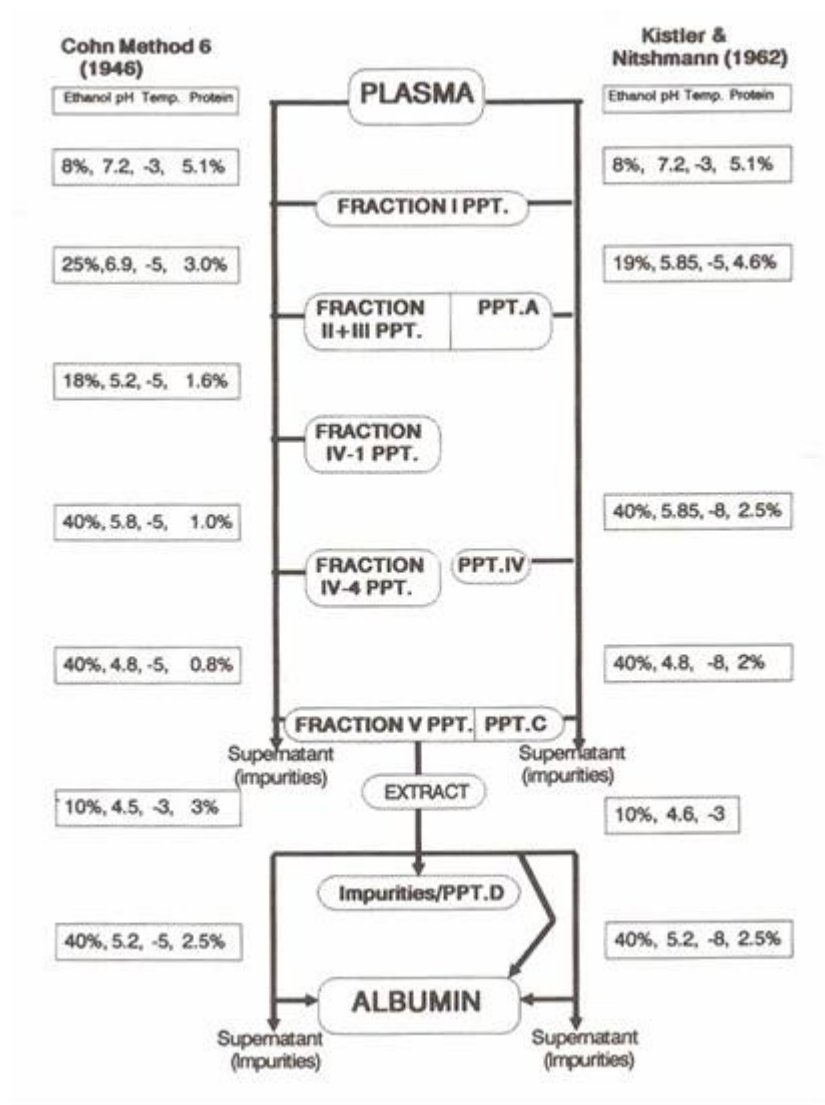
Fraccionamiento del plasma para la obtención de albúmina

En la actualidad, existe gran diversidad de métodos para el fraccionamiento proteico del plasma; Curling (1983) menciona la clasificación de Rothstein *et al.* (1977), la cual divide a los métodos basados en 1) solubilidad diferencial, 2) interacción diferencial con medio sólido e 3) interacción diferencial con campos físicos. Entre las técnicas más utilizadas en cada una de las categorías, se encuentran respectivamente el fraccionamiento alcohólico (1), la cromatografía de intercambio iónico (2) y la desnaturalización térmica diferencial (3).

El fraccionamiento por la técnica de Cohn (fraccionamiento alcohólico en frío) es el método más extendido y utilizado por la industria del fraccionamiento del plasma.

(Ver figura 2). Este método se basa en la solubilidad diferencial de la albúmina y otras proteínas con base en cinco variables: pH, temperatura, concentración del etanol, fuerza iónica y concentración proteica. En el método original, se parte de que la albúmina posee la mayor solubilidad y el menor punto isoeléctrico de todas la proteínas mayores del plasma; por tanto es la última proteína en precipitar bajo condiciones donde la concentración de etanol se aumenta en etapas, de 0% a 40%, con un descenso en el pH de 7 a 4,8 y de la temperatura a -5 °C. Otras proteínas como el fibrinógeno (Fracción I) y las inmunoglobulinas (Fracción II + III) son precipitadas en etapas anteriores (etanol al 8%, pH 7.2, -3 °C, 0,1% de proteína; y etanol al 25%, pH 6.9, -5 °C, 3% de proteína respectivamente) mientras que la albúmina (Fracción V) se mantiene en la fracción del sobrenadante durante la separación sólido-líquido de cada suspensión proteica generada según las condiciones (More y Harvey, 1991).

Existen numerosas modificaciones al método de Cohn que permiten que se dé el fraccionamiento a un menor costo y con un mayor rendimiento. Curling (1983) y More y Harvey (1991) mencionan que dentro de las modificaciones más importantes se encuentran la de Hink *et al.* (1957), la cual asegura mayor rendimiento al recuperar proteínas plasmáticas normalmente descartadas en la Fracción IV-1 y IV-4; la de Kistler y Nitshmann (1962), que provee un procedimiento más simple, pues se omite la fracción IV y se reduce el consumo del alcohol y resulta con mayor costo efectivo; y la de Schneider (1975) que corresponde al método de calentamiento con etanol. En la figura 2 se resumen los pasos propuestos por Cohn y colaboradores para la recuperación de las diversas fracciones del plasma, así como la modificación a este método propuesta por Kistler y Nitshmann.



Fuente: More y Harvey, 1991

Figura 2. Esquema de fraccionamiento de plasma según método de Cohn y método de Kistler y Nitschmann

Con respecto al método de Schneider, también conocido como desnaturalización térmica diferencial o termocoagulación selectiva, varios investigadores la han aplicado cuando el objetivo es obtener como único producto albúmina, puesto que la temperatura se eleva hasta casi 70 °C, temperatura a la cual todas las demás proteínas del plasma se desnaturalizan. Sin embargo, se emplean agentes como el caprilato de sodio y el N- acetil triptofanato de sodio para mantener la

estabilidad de la albúmina a dichas temperaturas (Hao, 1979a; More y Harvey, 1991; Moya *et al*, 2000.).

Tal como lo hicieron Marcelino y Guidolin (1991) del Instituto Butantan en Brasil, esta técnica se puede combinar con un paso anterior que consiste en la adición de un agente precipitante, en este caso, sulfato de amonio, que precipite a las inmunoglobulinas antes del calentamiento, de manera que éstas no se desnaturalicen y que puedan ser aprovechadas en la producción de suero antiofídico. Asimismo, se pueden emplear otros precipitantes como el etanol, el rivanol y el polietilenglicol (PEG). El PEG es un polímero sintético no tóxico, soluble en agua y es un agente frecuentemente empleado como precipitante en el fraccionamiento de plasma, ya que precipita las proteínas selectivamente según su peso molecular y carga neta. Los pesos moleculares de PEG más comúnmente usados son de 4000 y 6000. Esta técnica posee las ventajas de que no requiere un control rígido de la temperatura y de la fuerza iónica debido a que existe bajo riesgo de que se dé una desnaturalización proteica. (More y Harvey, 1991; Hao *et al.*, 1980).

Otra alternativa que con el paso del tiempo se vuelve cada vez más popular cuando se requiere fraccionar volúmenes menores de plasma, es la purificación de albúmina mediante técnicas cromatográficas tal como la cromatografía de intercambio iónico. Ésta consiste en la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. La separación de diferentes sustancias se lleva a cabo porque éstas tienen diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico debido a diferencias en sus cargas, densidades de carga y distribuciones de carga en su superficie. Estas interacciones pueden ser controladas variando condiciones como la fuerza iónica y el pH (Romero, 2002).

La cromatografía de intercambio iónico tiene muchas aplicaciones en el fraccionamiento del plasma y está adaptada a la extracción de proteínas a partir

de mezclas complejas. Los intercambiadores iónicos se utilizan tanto para extraer la(s) proteína (s) de interés de una fracción de plasma relativamente cruda o como un paso posterior de purificación para eliminar proteínas no deseadas. Como muchas proteínas poseen carga negativa a casi el pH neutral requerido para que se dé la actividad biológica, usualmente los intercambiadores aniónicos son empleados. (Burnouf, 1995).

Debido a la flexibilidad de estas técnicas y según el objetivo deseado, éstas se pueden combinar dentro del proceso de purificación de la albúmina. Por ejemplo se puede iniciar el método de Cohn, y a partir de la fracción II y III, se puede purificar el sobrenadante con cromatografía de intercambio iónico; o se puede realizar una precipitación previa con sulfato de amonio o PEG antes de calentarlo o de pasarlo por el intercambiador iónico, con el fin de recuperar alguna otra proteína además de la albúmina; asimismo las variables dentro de cada técnica se pueden modificar con el fin de purificar la albúmina de la manera más adecuada.

Utilización de la albúmina: funciones y especificaciones

Como se mencionó con anterioridad la albúmina posee importantes aplicaciones a nivel terapéutico y como reactivo de laboratorio, hecho que genera que sea vendida alrededor del mundo en grandes volúmenes.

Su utilidad terapéutica radica en que restaura y mantiene el volumen de la sangre en circulación (presión oncótica) para así evitar el riesgo de infarto, en situaciones tales como trauma, hemorragias, operaciones de cirugía, pérdida de sangre, quemaduras e intercambio de plasma. También se aplica cuando el paciente presenta desnutrición o deshidratación e infecciones crónicas. En los casos de enfermos de cirrosis o hepatitis, donde el hígado está dañado y difícilmente produce albúmina, también es necesario suministrarla de forma exógena. (Matejtschuk *et al.*, 2000; IVIC, 2005).

Generalmente se comercializa en dos concentraciones diferentes: 4-5% y 20-25%. La primera es una solución isotónica con respecto a la sangre, que tiene como función reponer los líquidos perdidos en caso de que se dé hipovolemia (disminución del volumen circulatorio). La segunda es una solución hiperoncótica con una osmolaridad de 1,500 mOsm/L, que sirve para el tratamiento de pérdida de fluidos cuando la administración de electrolitos o fluidos está contraindicada, o en caso de hipoproteinemia. Esta solución genera de cuatro a cinco veces la expansión del volumen intravascular (Matejtschuk *et al.*, 2000). Además, debido a que dentro de las funciones normales de la albúmina se encuentra el transporte de diferentes sustancias, la funcionalidad de las últimas está estrechamente relacionada con esta proteína; por ejemplo, en los neonatos hiperbilirrubinémicos, la bilirrubina se combina con la albúmina limitando así su ingreso a los tejidos hidrofóbicos del cerebro, atenuando con ello la toxicidad en los procesos hemolíticos graves que se presentan a esa edad. En el caso del calcio, la mitad del calcio circulante está combinado con la albúmina, por lo que la interpretación clínica de la disminución del calcio sérico depende de la concentración de la albúmina (IVIC, 2005).

Debido a que la materia prima de la albúmina en el caso de esta investigación es de origen equino, a nivel terapéutico, únicamente puede utilizarse en actividades veterinarias relacionadas con caballos; en este caso la albúmina resulta útil para realizar terapia de fluidos, para atender caballos con problemas de deshidratación, que hayan sufrido algún accidente deportivo, heridas o quemaduras. También puede emplearse en el tratamiento de enfermedades como anemia infecciosa equina, brucelosis y salmonelosis (com. pers: Estrada, 2006).

Con respecto a sus propiedades farmacocinéticas, el 40-45 % de la albúmina se encuentra intravascularmente y el 55-60% en el espacio extravascular. Si se aumenta la permeabilidad capilar, se puede alterar la cinética de la albúmina y se puede dar distribución anormal de la misma en caso de quemaduras severas o choque séptico. Bajo condiciones normales, la vida útil de la albúmina en el tejido

es aproximadamente de 16 a 18 días. El balance entre la síntesis y la degradación de la albúmina normalmente se da por regulación por retroalimentación. La eliminación es predominantemente intracelular y la realizan proteasas lisosómicas (Emerson, 1989).

Asimismo, la albúmina posee diversas aplicaciones a nivel de laboratorio debido a su estabilidad y a su capacidad de no interferir en reacciones bioquímicas, lo que la hace una proteína muy útil tanto en las labores de investigación, desarrollo y producción que se llevan a cabo en laboratorios e instituciones de investigación en el país. Por ejemplo, se puede emplear para: medios de crecimiento para cultivos de tejidos y células, como patrón de proteína, aditivo en diluyentes específicos, producción de vacunas, estabilizador de proteínas y conjugados, reactivos para inmunoensayo tales como RIA o ELISA y aplicaciones en biología molecular (Matejtschunk *et al.*, 2000).

Al igual que otros productos farmacéuticos que se mercadean alrededor del mundo, la albúmina debe cumplir ciertas especificaciones de manera que pueda utilizarse con fines terapéuticos. El producto ideal es albúmina monomérica, libre de la contaminación de otras proteínas plasmáticas, endotoxinas, virus, iones metálicos, agregados, activadores de la precalicreína, entre otros. Por ejemplo, en el caso de las endotoxinas, estas se asocian a reacciones febriles y el activador de precalicreína genera hipotensión. Para esto, diferentes organizaciones como la FDA (Food and Drug Administration), la EP (European Pharmacopeia), la USP (United States Pharmacopeia) y la BP (British Pharmacopeia) exigen ciertos requerimientos que debe tener un producto de manera que éste pueda ser administrado a los pacientes. (Ver cuadro 1).

Con respecto a la venta de albúmina como reactivo, ésta se encuentra en el mercado en gran número de presentaciones según el fin o la técnica para la cual se emplee. Sus características dependen del grado del reactivo, por ejemplo grado microbiológico o grado para biología molecular. Por lo tanto, cumplen ciertas

características como lo son: bajos en endotoxinas, libres de proteasas, ácidos grasos, endo y exo-desoxirribonucleasas, ribonucleasas y fosfatasa (Budnick y Fitzgerald, 2003). Los productos pueden provenir de diferentes fuentes: humana, bovina, porcina, equina, murina, canina, entre otros.

Cuadro 1. Especificaciones establecidas por la EP (European Pharmacopeia) para la comercialización de albúmina humana con fines terapéuticos

Criterio	Especificación (es)
Materia prima / Fuente	Plasma
Pureza de la albúmina	$\geq 95\%$
Concentración de albúmina	15% - 25 % 3,5% - 5%
Estabilizantes	Octanoato (caprilato de sodio) y/o N-acetil triptofano
Agente antimicrobiano	Ninguno
Pasteurización	10 h $60 \pm 0,5$ °C
Apariencia	Casi incolora, amarilla o verde
Identidad humana (usando antisuero específico)	Precipitación/Inmunoelectroforesis
pH	6,7 – 7,3
Contenido de hemo (absorbancia a 403 nm)	$\leq 0,15$
Actividad de la fosfatasa alcalina ($u\ g^{-1}$)	$\leq 0,1$
Activador de la precalicreína (PKA)	$\leq 35\ iu\ ml^{-1}$
Agregados	Área del pico de agregados/2 $\leq 5\%$ (HPLC)
Potasio ($\mu mol\ g^{-1}$)	≤ 50
Sodio ($mmol\ litro^{-1}$)	≤ 160
Almacenamiento a la oscuridad	5 años $2 - 8$ °C 3 años ≤ 25 °C
Aluminio ($\mu mol\ g^{-1}$)	≤ 200
Pirógenos	Prueba en conejos; dosis $10\ ml\ kg^{-1}$ (presentación al 5%), $3\ ml\ kg^{-1}$ (presentación al 20%)

Fuente: Matejtschuk *et al.*, 2000

Nuevas alternativas para la obtención de albúmina

La falta de un volumen de reserva suficiente para cubrir la necesidad de albúmina a nivel mundial, ha llevado a muchos investigadores a buscar nuevas fórmulas para multiplicar esta proteína. Aunque el gen y el ADNc (complementario al ARNm) de la albúmina humana han sido expresados en una variedad de sistemas microbianos, animales y vegetales, aún no hay un sistema recombinante de expresión que esté accesible en el mercado. La transformación nuclear es uno de

los métodos más utilizados para obtener albúmina recombinante; ésta se ha llevado a cabo en levaduras, bacterias y células de mamífero y de vegetales. Sin embargo, su elevado costo en el mercado hace que estos métodos de obtención no sean competitivos (Andonegi, 2006; Daniell, 2003).

Sijmons y colaboradores realizaron el primer intento reportado de expresar albúmina humana en plantas transgénicas en 1990, pero se obtuvieron niveles muy bajos de expresión (0,02% del total de proteínas). En caso de que se haya expresado, la albúmina no fue detectada en el citoplasma, lo que sugiere que la proteína no es estable en dicho compartimiento debido a su gran susceptibilidad a la degradación proteolítica (Daniell, 2003).

Al respecto, cabe mencionar que la creciente producción de proteínas en huéspedes heterólogos por medio del uso de la tecnología de ADN recombinante, ha puesto en evidencia el problema de la degradación proteolítica, el cual representa uno de los mayores obstáculos en la producción de albúmina recombinante, puesto que las proteínas recombinantes usualmente son consideradas por la célula como foráneas, y por tanto, son degradadas mucho más rápido que aquellas endógenas (Daniell, 2003).

Por dicha razón, en la actualidad, la extracción de esta proteína a nivel comercial, se continúa realizando a partir de fuentes como la sangre y en menor grado, placenta (Andonegi, 2006).

Por otra parte, Inmaculada Farran, investigadora de la Universidad Pública de Navarra (UPNA), logró producir albúmina humana de una manera fácil y económica en papas transgénicas. Según explica Farran, la gran ventaja de las plantas en este tipo de procesos es su gran flexibilidad en cuanto al volumen de producción, y a los bajos costos de implantación y producción (SARP, 2002).

En el año 2003, Alicia Fernández y colaboradores desarrollaron una técnica novedosa y más eficiente basada en la transformación plastidial, para producir de

forma recombinante albúmina humana en los cloroplastos de plantas de tabaco. Dicho método podría ser empleado como un sistema modelo para purificar o enriquecer, a partir de plantas transgénicas, proteínas biofarmacéuticas que sean altamente susceptibles a la degradación proteolítica. El método consiste en la hiper-expresión de la albúmina humana en cloroplastos transgénicos haciendo uso de una secuencia denominada Shine-Dalgarno (SD), la cual por lo general, facilita la hiper-expresión de transgenes. Sin embargo, en dichos ensayos, la expresión resultó en un nivel muy bajo (0.02% del total de proteína); por lo que se optó por modificar las secuencias regulatorias de la albúmina utilizando regiones no traducidas (UTRs por sus siglas en inglés) de los cloroplastos. Dicho cambio resultó en un incremento en el rendimiento de 500 veces con respecto a la expresión de albúmina humana en hojas transgénicas (11.1% de la proteína total) (Daniell, 2003; Fernández *et al.*, 2003).

El sistema plastidial permite extraer grandes cantidades de albúmina. Con la transformación nuclear, el nivel máximo que se obtiene es el 0,5% de la proteína soluble total de la planta, mientras que si se aplica el sistema plastidial el porcentaje se eleva al 7%, lográndose una media de 0,9 miligramos de albúmina por gramo de peso fresco de hoja (Daniell, 2003).

A pesar de las ventajas demostradas por los expertos, todavía hay mucho camino por recorrer, pues deben mejorarse los mecanismos de purificación de la proteína, así como asegurar que la proteína obtenida posea una estructura idéntica a su análoga en el mercado (Andonegi, 2006).

Técnicas empleadas para la evaluación del rendimiento y el grado de pureza de la albúmina

Determinación del rendimiento de albúmina mediante técnicas colorimétricas

Método de Biuret

El método de Biuret sirve para determinar proteínas totales en una muestra, ya que permite detectar la presencia de compuestos con dos o más enlaces peptídicos, por tanto se utiliza para identificar todas las proteínas y péptidos cortos, excepto los dipéptidos. El reactivo de Biuret está compuesto por sulfato de cobre (CuSO_4) e hidróxido de sodio (NaOH). El fundamento de este método se basa en que el ión Cu^{2+} en medio alcalino, interactúa con los iones N^{-3} de los grupos amino de las proteínas formando un quelato de color violeta. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra, por tanto se puede medir la misma por espectrofotometría (Wikipedia, 2006; Schosinsky *et al.*, 1997).

Verde de Bromocresol

Este método se basa en la capacidad que tiene la albúmina de fijar la forma aniónica (disociada) del indicador verde de bromocresol. Se produce un cambio en la intensidad del color (pasa de amarillo a azul) proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra. Esto se debe a que la albúmina favorece la disociación del indicador y a que la forma aniónica presenta un espectro de adsorción diferente a la no asociada (Schosinsky *et al.*, 1997).

Determinación de la pureza

En cuanto a la calidad de la albúmina obtenida, el parámetro principal por evaluar es el grado de pureza de la muestras. Para esto se emplean técnicas que no sólo permitan verificar la existencia de la albúmina en la muestra, sino también otras proteínas que estén presentes y que deberían eliminarse.

Electroforesis y análisis de densitometría

La electroforesis de proteínas en geles que comprenden una única matriz de poliacralamida comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE), es una de las técnicas mas ampliamente usadas para separar mezclas proteicas complejas, y así poder investigar las subunidades que la componen y verificar la homogeneidad de las muestras (Argüelles *et al.*, 2004).

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente interconector (bis-acrilamida) en presencia de un iniciador y un catalizador. Como catalizador se suele utilizar TEMED (N, N, N, N'-tetrametilnediamina) y como iniciador el ión persulfato que se añade en forma de persulfato de amonio (Madriz, 2005).

La técnica más poderosa para separar proteínas de una mezcla, es agregando un detergente iónico denominado SDS (duodecilsulfato de sodio) antes y durante la electroforesis. De esta manera, el SDS elimina los efectos de las diferencias en forma y longitud de la cadena mediante la modificación de la carga de las proteínas (Lodish *et al.*, 2003).

Las SDS-PAGE se pueden realizar empleando sistemas de una o más fases, en estos casos se habla de sistemas continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos se utiliza un gel espaciador o compactador que asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración. Sin embargo, la separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo gel (de separación). (Argüelles *et al.*, 2004).

Con respecto a la densitometría, esta permite cuantificar proteínas que han sido separadas electroforéticamente. Luego de pasar un electroferograma por un analizador densitométrico, se genera un trazo o curva donde el valor de densidad óptica es proporcional a la concentración proteica. El área bajo la curva de cada

pico electroforético es proporcional a la cantidad de proteína en la banda correspondiente (Lomonte, 1998).

ELISA

La técnica ELISA, cuyas siglas corresponden en inglés a “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, que significan “ensayo inmonoenzimático ligado a enzimas”, es una prueba para identificar anticuerpos o antígenos, que utiliza anticuerpos específicos que se unen covalentemente a enzimas, de manera que a través de la adición del sustrato adecuado, se genera un producto coloreado que puede medirse por espectrofotometría y que indica el grado de compatibilidad entre el anticuerpo y el antígeno. Las enzimas de unión típicas son la peroxidasa, la fosfatasa alcalina, y la β - galactosidasa. Hay ELISAs de tipo competitivo o no competitivo. Además dentro del último, existen dos metodologías de ELISA, una para la detección de antígeno (directo o “sándwich”), en la cual el antígeno es atrapado entre dos capas de anticuerpo, y la otra para la detección de anticuerpos (indirecto) (Reina, 2003 y Madigan *et al.*, 1999). Para efectos de la presente investigación, el ELISA directo es útil para conocer la presencia de inmunoglobulinas en las muestras de albúmina, con tal de determinar el grado de pureza de las mismas, ya que en este caso, las inmunoglobulinas son proteínas no deseadas.

Cromatografía en fase reversa por HPLC

Este tipo de cromatografía está constituida por una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar, de manera que los solutos no polares son retenidos y los solutos polares, eluidos. La fase estacionaria está formada por cadenas alifáticas de hasta dieciocho carbonos unidas a una matriz de silica. La fase móvil es un solvente polar como metanol, propanol, etanol o acetonitrilo. Las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, por lo que se usan contraiones como el ácido trifluoroacético para asociarse con grupos cargados en la proteína y

aumentar su hidrofobicidad. Además, este tipo de interacciones son a menudo muy numerosas, y para eluir las moléculas es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede sustituir el agua de la fase móvil con un solvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente (Romero, 2002).

OBJETIVOS

Objetivo General

Implementar un método para la purificación de albúmina a partir de plasma equino.

Objetivos específicos

1. Realizar una investigación bibliográfica acerca de la albúmina y sobre los métodos existentes para su extracción y purificación a partir de plasma.
2. Realizar la purificación de albúmina a partir de plasma equino mediante las siguientes técnicas: fraccionamiento alcohólico en frío, termocoagulación selectiva y cromatografía de intercambio iónico.
3. Evaluar el rendimiento y la pureza de la albúmina obtenida.
4. Diseñar un procedimiento para la purificación de albúmina a partir de los resultados de las técnicas evaluadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Adquisición de las muestras de plasma

Las muestras de plasma fueron proporcionadas por el Instituto Clodomiro Picado. Se utilizó plasma equino hiperinmune, el cual se tomó a partir del mismo plasma que se procesa para la obtención del suero antiofídico. El plasma se separa de la fórmula roja de la sangre, que se obtiene de la sangría de los caballos que fueron inmunizados previamente con veneno de serpiente. Dicha separación se logra mediante la adición de un anticoagulante (mezcla de ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa anhidra). En el caso, en que se empleó plasma normal, este se extrajo de la sangre de un caballo sin inmunizar.

Para prolongar la estabilidad del plasma, a este se le adicionó timerosal a una concentración de 0,005%. Para la mayoría de las pruebas, se tomaron volúmenes de plasma de 50 ml, el resto del plasma que no se estuviese utilizando, se mantuvo en refrigeración a 4 °C.

Purificación de albúmina

Se probaron diferentes técnicas descritas por diversos investigadores para valorar la eficacia de las mismas en cuanto a rendimiento y calidad de la albúmina obtenida. Las metodologías evaluadas fueron las siguientes:

- Fraccionamiento alcohólico en frío
- Termocoagulación selectiva con etanol
- Termocoagulación selectiva con polietilenglicol
- Cromatografía de intercambio iónico

Se variaron factores clave propios de cada una, con el fin de establecer los parámetros que proporcionaran mejores resultados. En general, se realizaron mínimo tres repeticiones de cada una de las pruebas realizadas, para evaluar la reproducibilidad de los resultados de las mismas.

Fraccionamiento alcohólico en frío

Se utilizó como base el protocolo de Hao (1979b), el cual es una modificación del método de Cohn. La metodología empleada se divide en dos etapas (ver figura 3): en la primera se diluyó plasma hiperinmune con agua destilada desionizada, se adicionó etanol, se bajó el pH de dicha mezcla a 5,8 con HCl 2M y se incubó durante mínimo dos horas a -5 °C. En la segunda etapa, se centrifugó la mezcla; al sobrenadante recuperado se le bajó el pH a 4,7 con HCl 2M. Finalmente se realizó una segunda centrifugación del sobrenadante acidificado y se recuperó el precipitado, el cual se resuspendió en NaCl al 0,9%. Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada marca Sorval General Purpose RC-3, a 3000 r.p.m por 12 minutos.

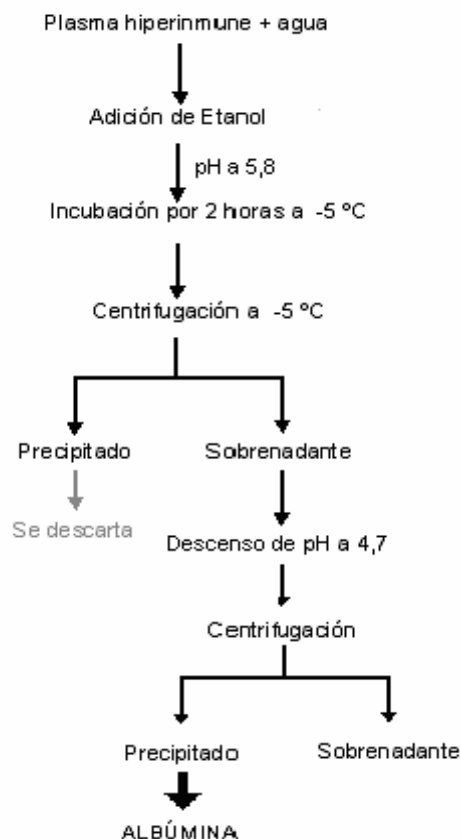


Figura 3. Esquema del método de Cohn modificado empleado para realizar el fraccionamiento alcohólico en frío para la obtención de albúmina

Dentro de esta metodología se evaluaron los siguientes aspectos:

- Dilución del plasma

El plasma se diluyó en agua destilada y desionizada, con el fin de que, al añadir el etanol, la concentración proteica quedara en un porcentaje determinado. Se probaron tres valores: al 1,3%, 1,5% y 1,7%. Estos datos teóricos se obtuvieron tomando como base que el plasma posee aproximadamente 7,5 g/dL de proteínas totales. Por otra parte, se hicieron pruebas en las que no se diluyó el plasma con agua antes de añadirle el etanol.

- Concentración alcohólica

La concentración de etanol empleada fue al 42%. Además, se probaron concentraciones al 38% y al 45%.

- Condiciones de incubación

La temperatura de incubación utilizada fue de -5°C. Otras temperaturas evaluadas fueron: -10°C, 4°C y a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se realizaron por 2 horas y para aquellas que debían hacerse a menos de 0°C, se empleó una centrifuga refrigerada marca Sorval General Purpose RC-3.

- pH

Corresponde al descenso del pH, aplicado al sobrenadante que se genera después de la primera centrifugación. Se estudiaron dos factores: el valor de pH y el tiempo que se deja pasar para que dicho descenso sea efectivo. Los valores de pH que se evaluaron fueron 4,7 y 4,4 con tal de determinar si dicha diferencia de valor genera que la albúmina quede en el sobrenadante o en el precipitado. El tiempo que se dejó pasar antes de llevar a cabo la segunda centrifugación fue de 20 horas.

También se probó una condición dentro del proceso que fue la sustitución de la centrifugación por la filtración. En lugar de realizar dos centrifugaciones, se llevaron a cabo dos filtraciones con papel filtro de 8 μm .

Termocoagulación selectiva

En todas las pruebas, se adicionó al plasma antes de calentarlo, caprilato de sodio como estabilizante, en una concentración de 0,004 M. Se emplearon dos sustancias diferentes: etanol y polietilenglicol (PEG). La incubación de las muestras se hizo en un baño maría con regulación de temperatura marca DIGI SYSTEM Lab Instruments modelo WB-1000D. Al igual que con el procedimiento anterior, las centrifugaciones se realizaron a 3000 r.p.m por 12 minutos, y según el volumen de las muestras y la temperatura requerida, se utilizó una centrífuga refrigerada marca Sorval General Purpose RC-3 o una centrífuga Eppendorf 5810.

Termocoagulación selectiva con etanol

Inicialmente el procedimiento consistió en mezclar el plasma con caprilato de sodio (0,004 M) y calentarlo a 60 °C por hora y media (Ver figura 4). A partir de este punto se continuó exactamente igual que el procedimiento anterior de fraccionamiento alcohólico en frío. Se bajó su pH a 5,8 con HCl 2M, y se adicionó etanol en una concentración del 42%. La temperatura se bajó a 5°C y se centrifugó; al sobrenadante generado se le bajó el pH a 4,7 con HCl 2M y se volvió a centrifugar. Se recuperó el precipitado y se resuspendió en NaCl al 0,9%.

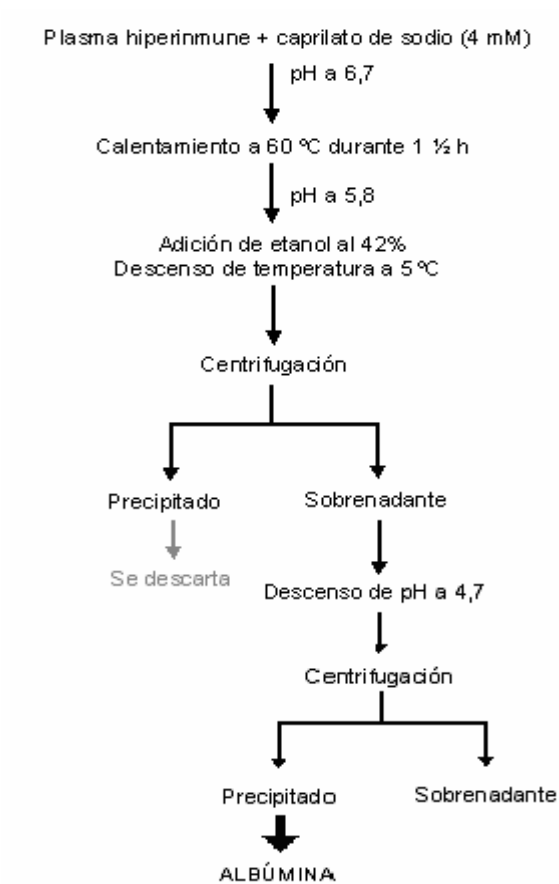


Figura 4. Esquema del método inicial de termocoagulación selectiva con etanol empleado para la obtención de albúmina

Este procedimiento se varió considerablemente con base en un método propuesto por Schneider *et al.* (1979). En la figura 5 se muestra un esquema que incluye las modificaciones realizadas, las cuales, se detallan a continuación:

- Concentración alcohólica

La concentración de etanol se bajó a 9%. Además, la adición se realizó antes de la incubación y no después.

- Condiciones de incubación

Se subió la temperatura a 65 °C y el tiempo de calentamiento se bajó a 30 minutos. Luego de la incubación, en lugar de llevar la mezcla a 5°C, se llevó a

temperatura ambiente con hielo. No obstante, también se evaluó el tiempo de calentamiento de 1½ hora, que es el que se aplicó en la primera metodología.

- pH

En lugar de descender el pH a 4,7 se bajó a 4,4. Este paso se realizó inmediatamente después de que se enfrió la mezcla incubada sin haber centrifugado, es decir sólo se aplicó un único paso de centrifugación. Sin embargo, se hicieron tres pruebas en las que se esperó 20 horas después de bajar el pH y antes de centrifugar.

- Pretratamiento del plasma con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 32%

Esta modificación tiene como fundamento un método propuesto por Marcelino y Guidolin (1991). Se diluyeron 50 ml de plasma en 100 ml de agua destilada desionizada y se adicionaron 38 g de sulfato de amonio a dicha mezcla (al 32%). El pH de la mezcla se llevó a 7 y se agitó durante 1 hora; posteriormente, se dejó reposar por 1½ hora a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se realizó una centrifugación y el sobrenadante recuperado, se dializó contra agua destilada durante 12 horas. El dializado resultante se ultrafiltró en un sistema de ultrafiltración marca Amicon 8050. A la muestra ultrafiltrada obtenida, se le aplicó la metodología que se presenta en la figura 5 y que incluye las modificaciones anteriormente presentadas.

Además, dentro de esta metodología modificada, se probaron otros aspectos como lo fue la dilución del plasma 1:2 y al 30% con agua destilada desionizada al realizar la mezcla inicial; la exclusión del caprilato de sodio y la agitación durante el calentamiento. Asimismo, se hizo una prueba en la que en lugar de emplear plasma hiperinmune como materia prima, se utilizó plasma normal.

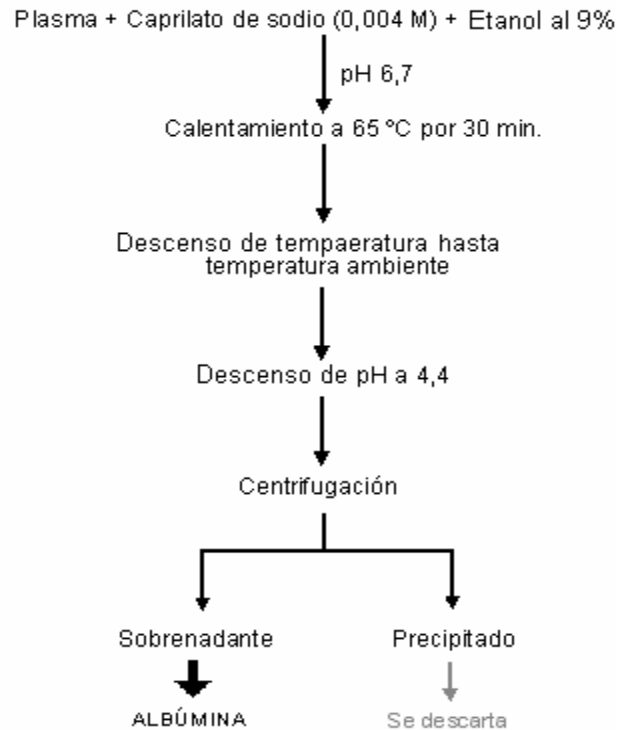


Figura 5. Esquema del método final de termocoagulación selectiva con etanol empleado para la obtención de albúmina

Termocoagulación selectiva con polietilenglicol (PEG)

Se tomó como base la metodología elaborada por Hao (1979a). En la figura 6 se muestra el esquema de la metodología ensayada y que se describe a continuación. Se prepararon 50 ml de una mezcla que contenía NaCl 0,15 M, caprilato de sodio 8 mM y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 6mM, y se adicionaron a 50 ml de plasma hiperinmune. El pH de la mezcla se llevó a 6,2 y se calentó a 65 °C durante 1 ½ h. Luego, se bajó la temperatura a 10 °C con hielo y se adicionaron 20 g de polietilenglicol (PEG) (al 20%). La mezcla se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Se disminuyó el pH de este a 4,7. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, y se recuperó el precipitado, el cual se resuspendió en solución salina (NaCl) al 0,9%.

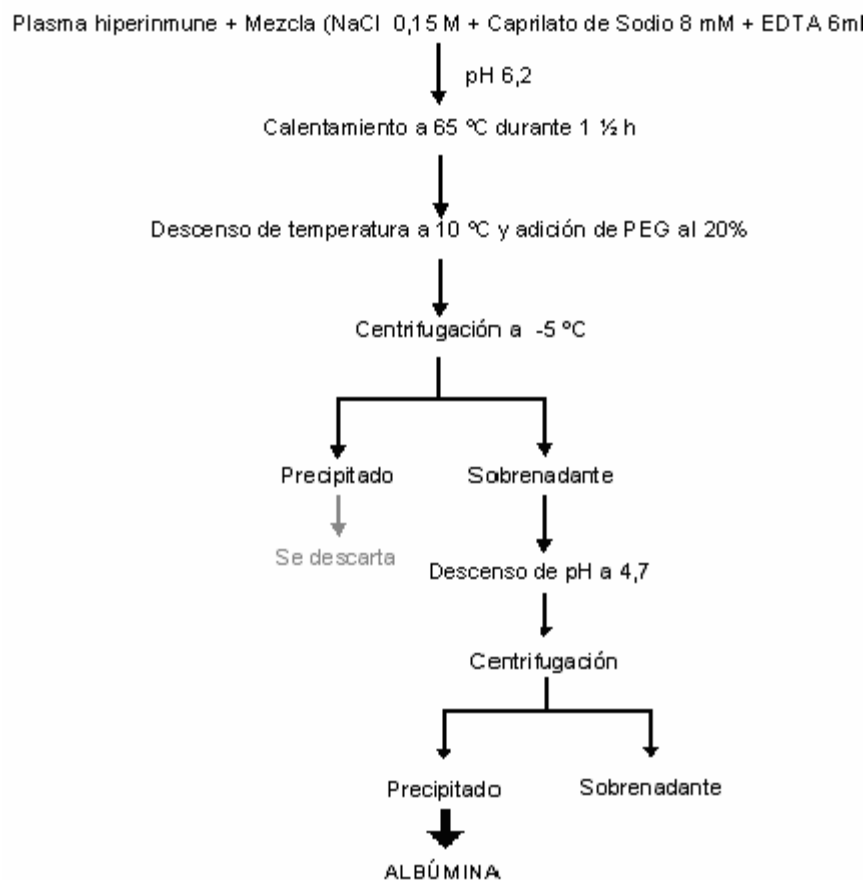


Figura 6. Esquema del de termocoagulación selectiva con polietilenglicol (PEG) empleado para la obtención de albúmina

Se llevaron a cabo dos variaciones, la primera fue centrifugar una única vez, es decir que luego de añadir el PEG, se bajó inmediatamente el pH a 4,7 y se centrifugó. La otra fue llevar a cabo el proceso a temperatura ambiente, sin añadir el caprilato de sodio a la mezcla inicial.

Cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de intercambio iónico a partir de plasma hiperinmune sin tratamiento previo

Se pasaron 50 ml de plasma hiperinmune a un valor de pH alrededor de 7, por una membrana de intercambio aniónico recubierta de amonio cuaternario de la marca

Sartorius, modelo Sartobind Single sep 5. Posteriormente se hicieron pasar por la columna 2 litros de agua destilada y desionizada. Para eluir la proteína de interés, se emplearon 1½ litros de NaCl al 30%. A lo largo de la corrida cromatográfica, se fueron recogiendo fracciones, en el primer ensayo de 200 ml y en el segundo de 50 ml. La membrana se lavó con 3 litros de agua destilada. Seguidamente se leyó la absorbancia de cada una de las fracciones a 280 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu; con los datos obtenidos se construyeron cromatogramas. Se escogieron aquellas muestras con mayor absorbancia a 280 nm para determinar su contenido proteico, de albúmina y realizar una SDS-PAGE al 10%.

Cabe mencionar que antes de cada una de las corridas, se realizó una determinación de cloruros con nitrato de plata (AgNO_3) en el agua que iba saliendo de la membrana de intercambio al lavarla, con el fin de asegurarse que no quedaran partículas de cloro adheridas a esta que fueran a interferir con la interacción iónica en el momento de la corrida (Ver anexo 1).

Cromatografía de intercambio iónico a partir de muestras finales de albúmina

Las pruebas consistieron en realizar cromatografías de intercambio iónico a las muestras finales de los siguientes procedimientos: termocoagulación con PEG, termocoagulación con etanol al 9% y fraccionamiento alcohólico en frío.

En este caso se empleó el mismo sistema de membranas de intercambio iónico recubiertas con amonio cuaternario de la marca Sartorius. Sin embargo, se empleó el modelo Q15, el cual es de menor tamaño y adaptable a jeringa. Se utilizaron jeringas estériles de 10 ml para pasar las muestras a través de las membranas. Antes de realizar la cromatografía, se hizo un lavado de cada membrana de la siguiente manera: se equilibraron con 10 ml de NaCl al 0,9%, luego se regeneraron con 10 ml de NaOH 1M y finalmente, se re-equilibraron con 20 ml de NaCl al 0,9%.

En las corridas cromatográficas, se inyectaron 3 ml de cada muestra a través de la membrana. Para eluir, se utilizó un gradiente de solución salina (NaCl) de 5%, 10%, 15%, 20% y 25%; en este caso, también se inyectaron 3 ml de cada solución. Se recogieron 22 fracciones por prueba, y se leyó la absorbancia de cada una a 280 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu para construir cromatogramas. Se escogieron aquellas muestras con mayor absorbancia a 280 nm para cargarlas en una SDS-PAGE al 10%.

Evaluación del rendimiento y pureza de albúmina en las muestras obtenidas

Determinación del rendimiento de albúmina mediante técnicas colorimétricas

Para cuantificar la presencia de proteínas en las muestras, se realizó una determinación de proteínas totales mediante el método de Biuret basado en la modificación de Schosinsky *et al.* (1997). Se adicionaron 50 µL de cada muestra por analizar a 2,5 ml de reactivo de Biuret; se hicieron triplicados de cada una; en el caso del blanco de reactivos, este se preparó empleando agua destilada. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Seguidamente, se leyó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1203. En el Anexo 2 aparece la preparación del reactivo.

Para cuantificar la albúmina en las muestras, se empleó la técnica del verde de bromocresol. Se modificó el protocolo descrito por Schosinsky *et al.* (1997) y se preparó una dilución de la muestra de 100 µL en 2,5 ml de solución salina de cloruro de sodio (0,85 g/dL). Posteriormente, se tomaron 0,5 ml de dicha dilución y se adicionaron a 2,5 ml de verde de bromocresol; las muestras se incubaron 5 minutos y se leyó su absorbancia a 630 nm. En el anexo 2 aparece la preparación del reactivo

Para ambas determinaciones, se crearon curvas de patrones con concentraciones conocidas, y se empleó el programa computacional Excel para que generara una ecuación de recta, que sirvió para interpolar las absorbancias de las muestras obtenidas y conocer la concentración (en g/dL) de proteínas totales o albúmina de las mismas. En el caso del método de Biuret se emplearon patrones de albúmina comerciales grado estándar de proteína (Sigma-Aldrich) de concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 g/dL. Para generar la curva del método de verde de bromocresol, se emplearon estos mismos patrones pero en concentraciones de 2, 3 y 4 g/dL.

Determinación de la pureza

Electroforesis

Se realizaron electroforesis SDS-PAGE al 10 % para observar el patrón de bandas generado por cada muestra según su contenido proteico (Laemmli, 1970). Se empleó un sistema electroforético discontinuo. Para cargar las muestras en el gel, primero se diluyeron 1:2 en *buffer* no reductor, y se cargó en cada pozo la cantidad de microlitros necesaria para que todas las muestras quedaran ajustadas a una concentración proteica de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (el ajuste se hizo con base en la concentración proteica determinada por el método de Biuret). En aquellos casos en que la concentración proteica fuera muy baja, se cargaron 10 μL de todas las muestras en el gel para que fuera comparativo. Cabe mencionar que en todas las corridas, se cargó una muestra de plasma y un patrón comercial de albúmina.

Las muestras se corrieron durante 45 minutos a 180 V en una fuente de poder Bio-Rad Power PAC 300. Para realizar la tinción de los geles una vez terminada la corrida, se utilizó azul de Comassie, y luego de decolorarlos, se visualizaron en un transiluminador de luz blanca marca Logan Desk Top Light Box (En el anexo 3 se presentan la preparación de los reactivos y las cantidades de preparación de gel)

Densitometría

El análisis de la densidad óptica se llevó a cabo con el software computacional Image Pro Plus®. Se escanearon los geles teñidos y decolorados obtenidos en las SDS-PAGE, y las imágenes resultantes se sometieron a un análisis por parte del software. A partir de los datos de densidad óptica que se obtuvieron, se generaron curvas. Al determinar el área bajo la curva correspondiente a la albúmina, se pudo establecer el porcentaje de pureza y rendimiento de recuperación de albúmina de cada una de las muestras sometidas al análisis.

El porcentaje de recuperación de albúmina se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ rendimiento albúmina} = \frac{[\text{albúmina}]_{\text{final}} \times \text{volumen recuperado}}{[\text{albúmina}]_{\text{inicial}} \times \text{volumen inicial de plasma}} \times 100$$

En todos los cálculos, el dato de la concentración inicial de albúmina fue de 29 g/L. Cabe mencionar que los datos de la determinación de albúmina y de rendimiento de recuperación de esta, se reportan basados en el análisis densitométrico y no en el método de Verde de Bromocresol. Esto se debe a que los resultados que se obtuvieron por este método fueron bastante inconsistentes y por tanto, se excluyeron en los cálculos

Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

Se realizó una cromatografía de fase reversa en un equipo de HPLC marca Agilent 1100 Series, a través de una columna analítica C4 (cuatro carbonos) marca Vydac de 150 x 4,6 mm. Se prepararon dos fases móviles, una contiene 95% de agua desionizada y 5% de acetonitrilo, y la otra contiene 95% de acetonitrilo y 5% de agua desionizada (cada una con 0,1% de ácido trifluoroacético). Se corrieron muestras finales de los procedimientos, así como de dos patrones comerciales (Sigma-Aldrich) de albúmina (grado reactivo y estándar

de proteína), plasma hiperinmune (los tres últimos en una concentración de 2 mg/ml). Se inyectaron 20 µL de muestra por corrida; cada corrida duró 45 minutos y se realizó con un flujo de 1 ml/min.

ELISA

Se realizaron tres ELISA del tipo directo a las muestras finales de los procedimientos para cuantificar la cantidad de IgG de caballo en las mismas. Las placas fueron recubiertas con veneno de serpiente (*Bothrops asper* Atlántico+Pacífico), con 3 µg/hoyo. Las muestras se diluyeron en leche al 2% en PBS en diluciones de 1/1000. Además, se montó una curva patrón a partir de suero antiofídico del lote 380PO en diluciones dobles. El conjugado empleado fue anti-IgG de caballo unido a peroxidasa y se añadió en una dilución de 1/6000; el sustrato fue peróxido de hidrógeno (H₂O₂) unido a un cromógeno (OPD). Las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un lector de ELISA marca Shimadzu UV-1203 a 492 nm.

Diseño de un procedimiento para la purificación de albúmina

Luego de probar y evaluar las diferentes técnicas de fraccionamiento del plasma para la purificación de albúmina, se propuso un procedimiento adecuado, en el cual se combinaron las técnicas evaluadas de forma secuencial según su funcionalidad, de manera que en cada etapa del procedimiento se vaya obteniendo albúmina más pura.

RESULTADOS

Proceso de purificación de albúmina

En los procesos de purificación de albúmina basados en precipitaciones, es decir, el fraccionamiento alcohólico en frío y la termocoagulación selectiva con etanol y PEG, en general, se observaron a nivel macroscópico comportamientos similares entre sí. Una vez que se añadió el etanol o el PEG según el caso, se observó un precipitado blanquecino (Figura 7 A1 y B1).

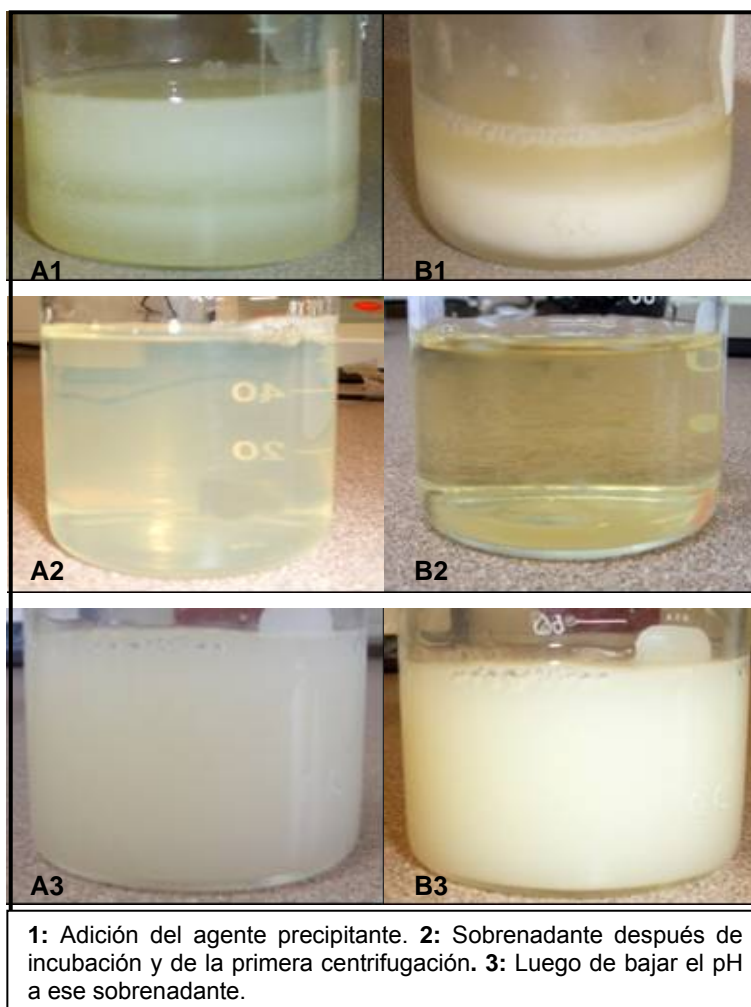


Figura 7. Imágenes de las diferentes etapas de la purificación de albúmina mediante fraccionamiento alcohólico en frío (A) y termocoagulación con PEG (B).

Como se puede observar en la figura anterior, en el caso del PEG (B1), la precipitación es inmediata y por eso el precipitado aparece en el fondo del recipiente. En el caso del etanol (A1), la mayoría de las proteínas precipitadas queda en suspensión; esto ocurre tanto en el fraccionamiento en frío con etanol, como con la termocoagulación con etanol. Estas mezclas pasan por un proceso de incubación por un lapso determinado, ya sea a -5°C o a 65°C , y posteriormente se realiza una centrifugación. Las imágenes A2 y B2 corresponden al sobrenadante que se genera luego de dicha centrifugación, el cual contiene la albúmina y se le han eliminado las proteínas contaminantes que habían sido precipitadas en el paso anterior. Se puede notar, que en el caso del PEG (B2), el líquido es transparente y amarillo; en cuanto al etanol en frío (A2), éste es un poco opaco y verdoso; este mismo comportamiento ocurre en la termocoagulación con etanol. El precipitado que se deshecha en este punto es blanco y pastoso. Por último, las imágenes A3 y B3, muestran la precipitación de proteínas en dicho sobrenadante producto de la acidificación del mismo. Se puede observar que en ambos casos, el sobrenadante se vuelve turbio. Después de este paso, dicho sobrenadante es nuevamente centrifugado para recuperar la albúmina, que según el valor del pH al que se haya ajustado, se recupera en el sobrenadante ($\text{pH} = 4,4$) o el precipitado ($\text{pH} = 4,7$).

Resultados de pureza y rendimiento

Fraccionamiento alcohólico en frío

En las figuras 8, 9 y 10 se muestran electroforesis con los resultados de las modificaciones realizadas al método de fraccionamiento en frío con etanol modificado a partir del método de Cohn. En general todas las muestras obtenidas poseen algún grado de contaminación de proteínas o agregados de éstas, de alto peso molecular (alrededor de 150 kDa).

En la figura 8, se muestra el patrón de bandas de las muestras finales de albúmina obtenidas con diferentes concentraciones de etanol (al 42%, al 38% y al 45% respectivamente). La banda correspondiente al peso molecular de la

albúmina se muestra con una flecha. Se puede observar que en los tres casos, se lograron eliminar proteínas contaminantes con respecto al plasma (carril "PI"), sin embargo, la pureza y recuperación de albúmina es mayor en el caso de la concentración de etanol al 42% (85% de pureza y 57,68% de rendimiento).

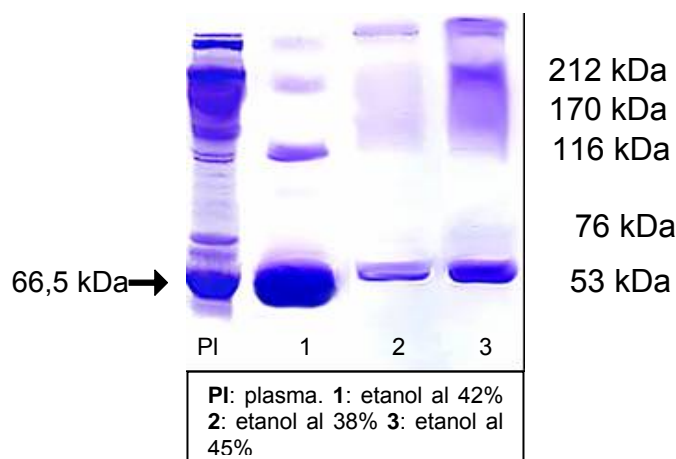


Figura 8. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío con diferentes concentraciones de etanol.

Al variar la temperatura de incubación, se obtuvieron los resultados que se presentan en la figura 9, los carriles 1, 3 y 5 corresponden a las precipitados finales obtenidos a temperatura ambiente, 4 °C y -5 °C respectivamente. Se denota que a -5 °C se obtuvo el mejor resultado en cuanto a pureza (85%); sin embargo la muestra obtenida a -10 °C, cuyo patrón de bandas no se muestra en la figura, presentó un porcentaje de pureza cercano al 80%. Nótese que en todos los casos se pierde algún porcentaje de albúmina, puesto que queda en el sobrenadante que se descarta.

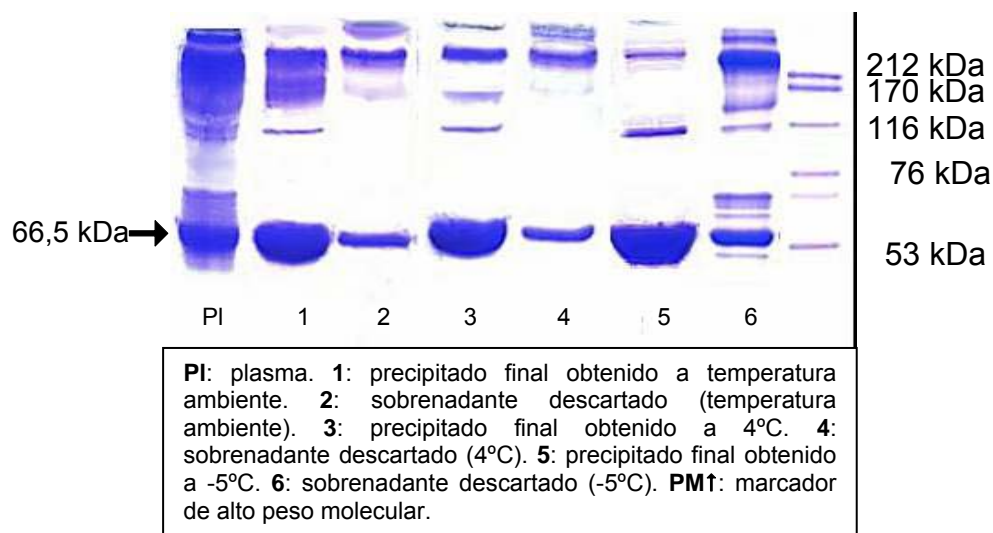


Figura 9. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío a diferentes temperaturas.

En la figura siguiente se muestran los resultados del patrón de bandas obtenido al evaluar el pH y el tiempo de incubación que se dejó pasar luego de bajarlo y antes de centrifugar por segunda vez. Al evaluar la acidificación del pH a los valores de 4,7 (carriles 3 y 4) y 4,4 (carriles 1 y 2), los resultados fueron similares; la mayor diferencia radica en que, la muestra final del tratamiento a pH 4,4 es un sobrenadante y que por lo general, la muestra final a pH 4,7 es un precipitado. Con respecto a esto, es importante mencionar que aún bajando el pH a 4,7, en algunas pruebas la albúmina quedó en el sobrenadante. Asimismo, se observó que cuando se incubaron las muestras 20 horas después de bajarles el pH, la pureza aumentó significativamente, pues por análisis densitométrico, la muestra posee un 96% de pureza, sin embargo el rendimiento disminuyó, principalmente en el caso de la muestra a pH 4,7.

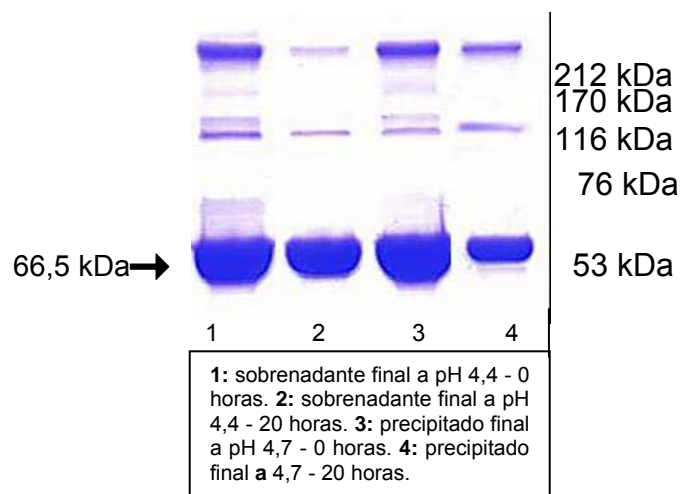


Figura 10. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío con diferentes valores de pH y tiempos de incubación luego de bajar el pH.

Además se realizaron otras variaciones a la metodología, como evaluar la eficiencia de la filtración en lugar de la centrifugación y diferentes porcentajes proteicos producto de la dilución inicial del plasma con agua destilada. En cuanto a la filtración, esta fue eficiente en el caso de la primera separación, en el cual se eliminan las proteínas precipitadas luego de la incubación. No obstante, en la segunda separación, el filtro de 8 μ m no fue capaz de separar las proteínas, obteniéndose una muestra final muy contaminada con un 33% de pureza. (Ver imagen en anexo 4). Con respecto a la dilución del plasma se probaron tres diluciones diferentes para obtener una concentración de proteínas de 1,3, 1,5 y 1,7%. Sólo funcionó la concentración a 1,7%, la cual fue la que se empleó en todas las muestras analizadas. En el caso de las otras dos concentraciones, al bajar el pH en las etapas finales del proceso, se presentó poca o nula precipitación de proteínas y las electroforesis no mostraban ningún patrón de banda. Asimismo, se hicieron pruebas sin diluir el plasma, y si bien la pureza fue de 83%, el rendimiento de recuperación de albúmina fue de 12,45%.

En el cuadro 2 se presenta el porcentaje de pureza y rendimiento promedio de cada uno de los diferentes tratamientos mencionados. El porcentaje de pureza

proviene del análisis de densitometría y el porcentaje de rendimiento de la determinación de proteínas totales por el método de Biuret. Además, se muestra el porcentaje de rendimiento de recuperación de albúmina, calculado a partir de los dos datos anteriores. En general, todas las muestras presentaron una concentración proteica baja (entre 1,4 y 7,6 g/L). En cuanto a pureza el mejor resultado (96%) se obtuvo con el fraccionamiento alcohólico al 42% de etanol, a pH 4,4 y dejando que pasaran 20 horas antes de la segunda centrifugación; no obstante, el rendimiento de recuperación de albúmina de esta variación fue muy bajo (alrededor del 5%). En referencia a este aspecto, el rendimiento de albúmina más alto (57, 68%), lo presentó el fraccionamiento con etanol al 42% a pH 4,7.

Cuadro 2. Resultados del rendimiento y pureza obtenidos en muestras finales de albúmina mediante fraccionamiento alcohólico en frío.

Prueba	Volumen inicial plasma (ml)	Volumen final recuperado (ml)	Concentración final proteínas (g/L)	Concentración final albúmina (g/L)	Rendimiento albúmina (%)	Pureza (±1%)
Etanol al 42% pH 4,7	50	125	7,60	6,46	57,68	85
Etanol al 38%	50	133	***	-	-	38
Etanol 45%	50	165	***	-	-	23
Etanol al 42% a -10°C	50	100	7,00	5,53	39,50	79
Etanol al 42% a 4°C	50	91	7,00	5,22	33,90	75
Etanol al 42% a T ambiente	30	91,5	2,50	1,43	15,52	57
Etanol al 42% pH 4,4	30	22,5	1,40	1,02	2,74	73
Etanol al 42% pH 4,4 + 20 h	30	25	1,70	1,63	4,86	96
Etanol al 42% pH 4,7 + 20 h	30	25	1,80	1,40	4,18	78
Etanol al 42% con filtración	30	21,5	4,80	1,58	4,05	33
Plasma sin diluir	30	21	6,00	4,98	12,45	83

*** El método de Biuret no detectó la concentración proteica en la muestra

Termocoagulación selectiva

Termocoagulación selectiva con etanol

Inicialmente, se llevó a cabo una metodología similar a la anterior, con la diferencia de que al inicio el plasma fue calentado a 65 °C (Ver figura 11). Con dicha variación (carril 1) se obtuvo una pureza del 72%, sin embargo el porcentaje de recuperación de albúmina no se pudo determinar debido a la considerablemente baja concentración proteica en la muestra. Por otra parte, se aplicó otra metodología de termocoagulación con etanol al 9% (carril 3) que dio como resultado una pureza de 94% y una concentración proteica de 20 g/L (ver cuadro 3). En el caso de la primera metodología la albúmina se obtiene en el precipitado y con etanol al 9%, la albúmina queda en el sobrenadante.

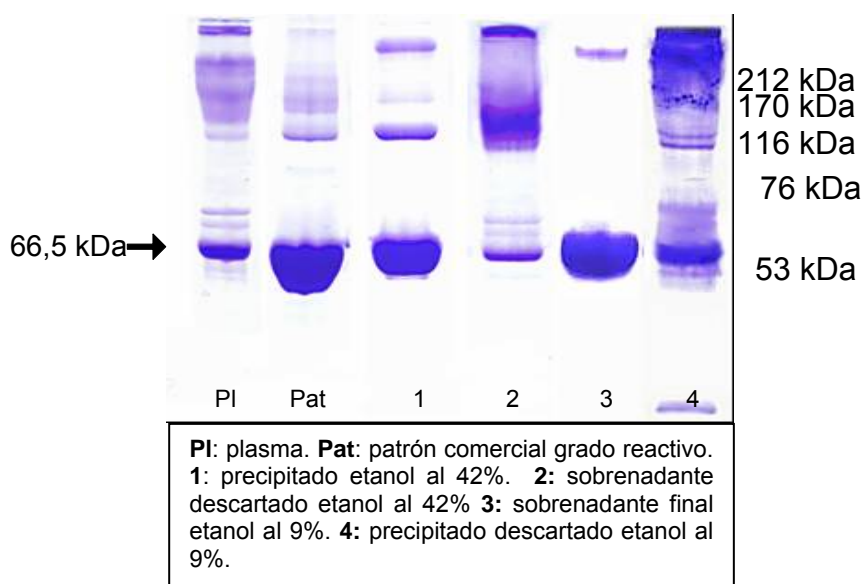


Figura 11. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con etanol

Entre las variaciones que se realizaron a la metodología, se encuentra la mezcla inicial del plasma antes de calentarlo, específicamente en cuanto a la dilución con agua destilada y la adición de caprilato de sodio. Al diluir el plasma 1:2 y al 30% (carriles 2 y 3 de la figura 12), se obtiene un buen grado de pureza, incluso al diluir

el plasma con una tercera parte de agua, se obtiene una pureza de prácticamente el 100%, pero la recuperación de albúmina es muy baja. Con respecto a esto, cuando el plasma se diluyó con agua en partes iguales, el porcentaje de recuperación de albúmina fue de los mayores en relación al método en cuestión (34%). Además, en el cuarto carril de la figura 12, se presenta una muestra final a la cual no se le adicionó caprilato de sodio a la mezcla inicial, se denota que la recuperación de albúmina fue muy baja.

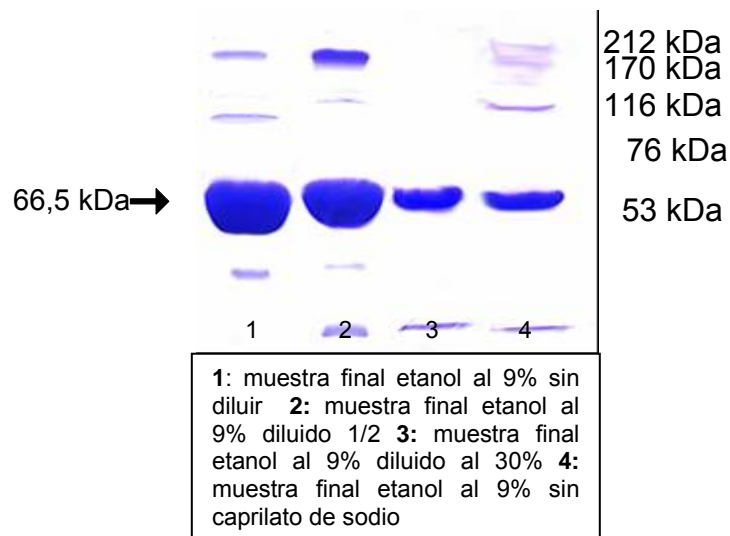


Figura 12. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con etanol

Otras modificaciones realizadas a la termocoagulación con etanol al 9%, fueron aumentar el tiempo de calentamiento a una hora y media, y aplicar agitación durante dicho proceso (carril 1 y 2 de la figura 13). En ambos casos, se logró eliminar gran parte de las proteínas contaminantes (principalmente al calentar por un periodo más largo), pero el rendimiento en ambos casos fue bajo. Por otra parte, también se probó dejar pasar 20 horas después de bajar el pH a 4,4 y centrifugar (carril 3); en este caso, fue cuando se obtuvo mayor volumen de sobrenadante con albúmina (35 ml a partir de 50 ml de plasma), por lo que el rendimiento de recuperación de esta proteína fue el más alto (35%) y con una pureza del 92% (ver cuadro 3).

Con respecto a los resultados que se obtuvieron al pre-tratar el plasma con sulfato de amonio (carril 4 de la figura 13), se obtuvo una pureza del 84%, y se observó que esta sal precipitó mayoritariamente proteínas contaminantes, dejando la albúmina en suspensión. Por último, al aplicar el proceso de termocoagulación selectiva a plasma normal (carril 5), se obtuvo la mayor concentración proteica (23, 4 g/L) de todas las muestras evaluadas en esta investigación, con una pureza del 94%, por lo que se recuperaron 22, 00 g/L de albúmina; pero, el rendimiento de recuperación fue del 25%.

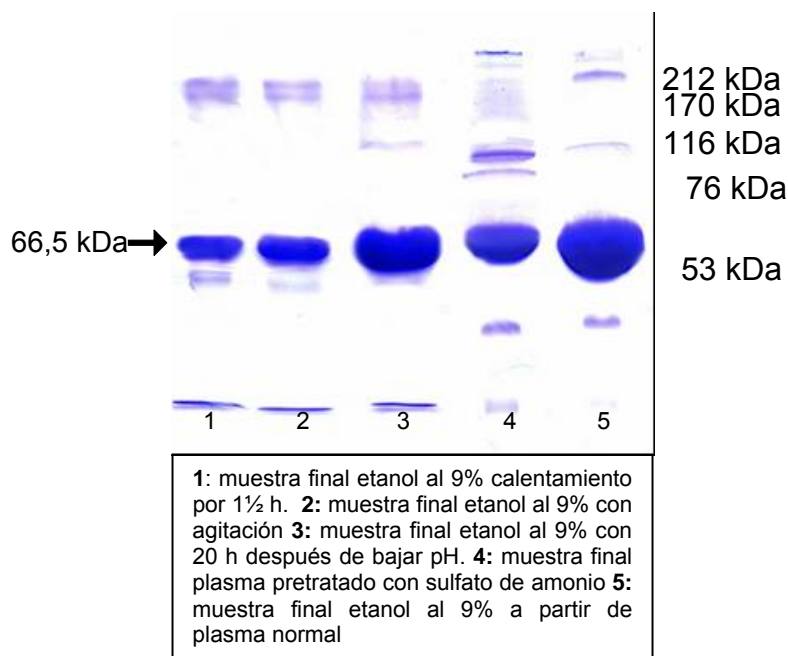


Figura 13. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con etanol

Cabe mencionar que al llevar a cabo la metodología con etanol al 9%, luego de la incubación a 65 °C, se formó una estructura sólida de color amarillento similar a un “flan” que dificulta considerablemente las siguientes etapas del proceso. Dicha estructura no se formó cuando se diluyó el plasma, al agitar y con el tratamiento previo del plasma con sulfato de amonio.

A continuación se resumen los resultados de rendimiento y pureza promediados de las muestras que se mencionaron anteriormente. Se puede notar que en el caso de la termocoagulación con etanol al 9%, en general la pureza es alta y que

la concentración proteica de las muestras es la más alta entre los métodos evaluados en este trabajo. Sin embargo, los porcentajes de recuperación de albúmina con respecto a la que había inicialmente en el plasma son bajos.

Cuadro 3. Resultados del rendimiento y pureza obtenidos en muestras finales de albúmina mediante termocoagulación con etanol.

Prueba	Volumen inicial plasma (ml)	Volumen final recuperado (ml)	Concentración final proteínas (g/L)	Concentración final albúmina (g/L)	Rendimiento albúmina (%)	Pureza ($\pm 1\%$)
Etanol al 42%	50	25	***	-	-	72
Etanol al 9%	50	23	20,00	18,80	31	94
Etanol al 9% plasma diluido 1/2	50	55	11,40	8,66	34	76
Etanol al 9% diluido al 30%)	50	20	5,04	5,04	7	>99
Etanol al 9% sin caprilato	50	15	9,94	8,45	9	85
Etanol al 9% calentado por 1½ h	50	17,5	9,00	8,01	10	89
Etanol al 9% con agitación	50	20	9,00	6,30	9	70
Etanol al 9% con 20 h después de baja pH	50	35	15,00	13,80	35	92
Etanol al 9%, pretratamiento del plasma con sulfato de amonio	50	65	11,60	9,74	45	84
Etanol al 9% a partir de plasma no hiperinmune	50	16	23,40	22,00	25	94

*** El método de Biuret no detectó la concentración proteica en la muestra

Polietilenglicol (PEG)

Los resultados obtenidos por la termocoagulación selectiva con PEG, se resumen en la figura 14 y el cuadro 4. Los carriles del 1 al 4 de la figura 14 presentan el patrón de bandas proteico de las muestras generadas a partir de todo el proceso de obtención de la albúmina. El carril 1 corresponde al sobrenadante recuperado luego de la incubación a 65°C con PEG y el carril 2, al precipitado que se descarta en este punto. Al bajarle el pH a 4,7 a dicho sobrenadante y centrifugarlo, se obtienen las muestras de los carriles 3 y 4; el carril 3 es el sobrenadante que en este caso se descarta, y el carril 4 es el precipitado final donde se recupera la albúmina. Se puede notar, que en la primera centrifugación se da una buena separación entre la albúmina y las proteínas contaminantes, e incluso este primer sobrenadante presenta un grado alto de pureza (93%). Luego de que a este se le baja el pH a 4,4 y se centrifuga, el precipitado obtenido (carril 4), presentó en promedio un porcentaje de pureza del 95%. Con respecto a las variaciones del método, se probó bajar el pH después de calentar e inmediatamente centrifugar (análogo al proceso del etanol al 9% directo); en el caso del PEG, no se obtuvieron buenos resultados, tal como lo muestran los carriles 5 y 6 de la figura 14, pues no se logró separar la albúmina del resto de proteínas. Además, se realizó el procedimiento original, solo que el plasma no se calentó, es decir se dejaron precipitar las proteínas a temperatura ambiente; en los últimos dos carriles de la figura 14, se muestra el primer sobrenadante y el precipitado final, los cuales, si bien presentan menor cantidad de proteínas que el plasma, no igualan la pureza del método en caliente.

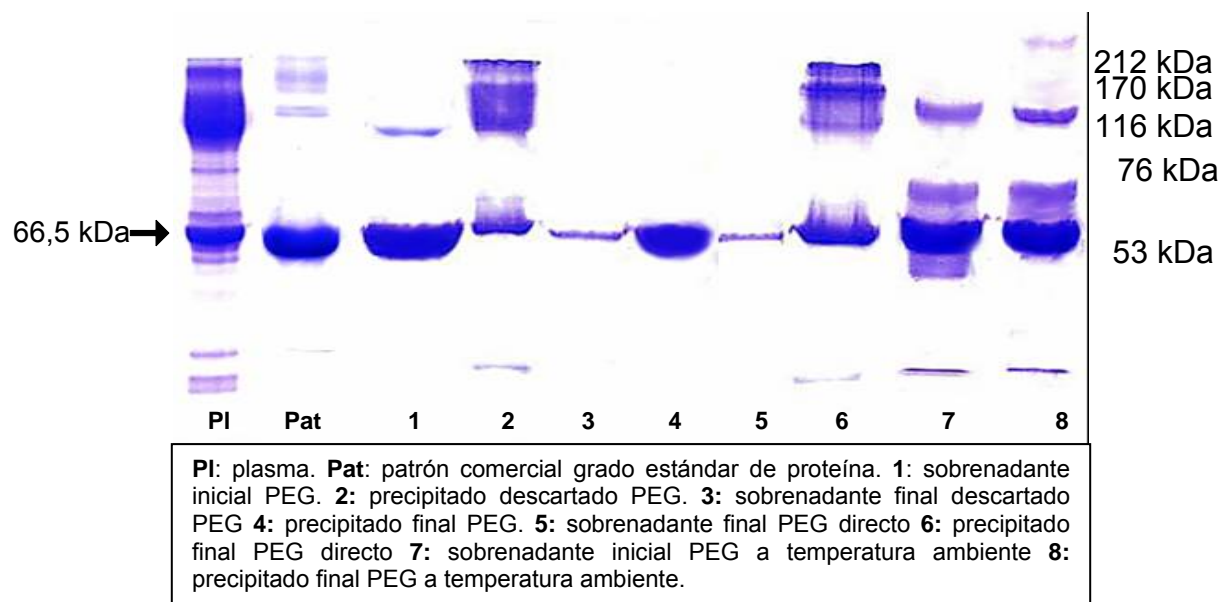


Figura 14. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante termocoagulación selectiva con polietilenglicol

Al igual que en los cuadros anteriores, en el cuadro 4, se presentan los porcentajes de rendimiento y pureza promediados de las muestras finales obtenidas por la termocoagulación con PEG. En este caso fue en el que se obtuvo mayor porcentaje de recuperación de albúmina, y en el caso del proceso sin modificaciones, se obtuvo un porcentaje de pureza alto (95%).

Cuadro 4. Resultados del rendimiento y pureza obtenido en muestra finales de albúmina mediante termocoagulación con polietilenglicol (PEG).

Prueba	Volumen inicial plasma (ml)	Volumen final recuperado (ml)	Concentración final proteínas (g/L)	Concentración final albúmina (g/L)	Rendimiento albúmina (%)	Pureza ($\pm 1\%$)
Segundo precipitado del método normal	50	121	7,00	6,65	57	95
Primer sobrenadante del método normal	50	90	10,00	9,30	60	93
Segundo precipitado a temperatura ambiente	50	70	16,00	11,82	59	74
Primer sobrenadante temperatura ambiente	50	120	7,60	4,46	38	59

Cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de intercambio iónico sin tratamiento previo del plasma

La figura 15 contiene los cromatogramas de la absorbancia a 280 nm de las diferentes fracciones recuperadas a partir de dos cromatografías de intercambio aniónico de plasma. En ambos, se observan dos picos bien definidos, correspondientes a la presencia de una mayor concentración proteica. Una vez, que se cargó la fracción con mayor absorbancia a 280 nm de cada una de las corridas, en una electroforesis de SDS-PAGE, se obtuvieron los patrones de banda que se presentan en la figura 16. Los porcentajes de pureza en ambas pruebas fueron muy bajos, 53% para la prueba 1 (carril 1) y 32% para la prueba dos (carril 2). Además, la concentración de proteínas totales fue de 7 y 8 g/L respectivamente.

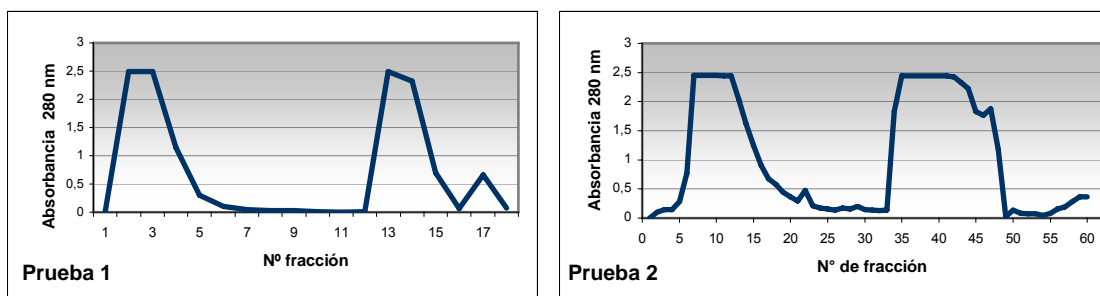


Figura 15. Cromatogramas de la absorbancia a 280 nm de la cromatografía de intercambio aniónico de plasma hiperinmune

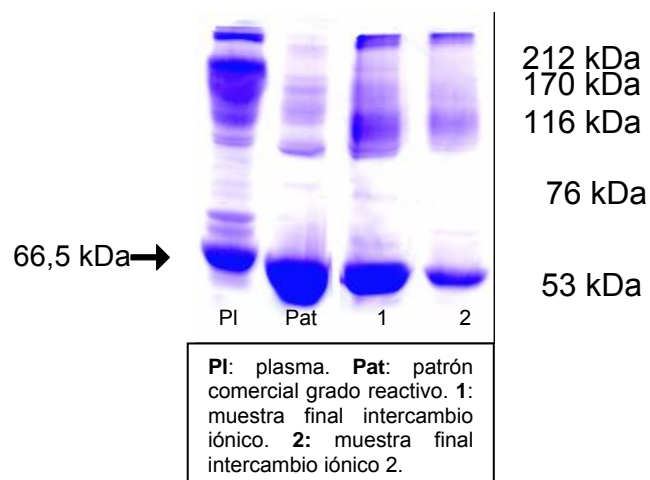


Figura 16. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante cromatografía de intercambio iónico sin tratamiento previo del plasma

Cromatografía de intercambio iónico a partir de muestras finales de albúmina

Al pasar muestras finales de los procedimientos de fraccionamiento alcohólico en frío y termocoagulación selectiva con PEG y etanol al 9%, se observaron comportamientos similares entre sí, ya que en todos los casos se eliminó algún porcentaje de proteínas contaminantes, es decir, se incrementó el porcentaje de pureza. En el cuadro 5 y en la figura 17, se incluyen los resultados de cada muestra antes y después de pasarla por las membranas de intercambio. Cabe mencionar que durante las diferentes corridas cromatográficas, el pico de la albúmina es el que corresponde a la fracción eluida con NaCl al 5%. En el anexo 5 se muestran los cromatogramas correspondientes.

Cuadro 5. Comparación del porcentaje de pureza de muestras finales de albúmina antes y después de la cromatografía de intercambio iónico

Método	Pureza de la muestra antes de la cromatografía (%)	Pureza de la muestra después de la cromatografía (%)
Termocoagulación selectiva con PEG	72	91
Termocoagulación selectiva con etanol al 9%	92	93
Fraccionamiento alcohólico en frío al 42%	73	>99

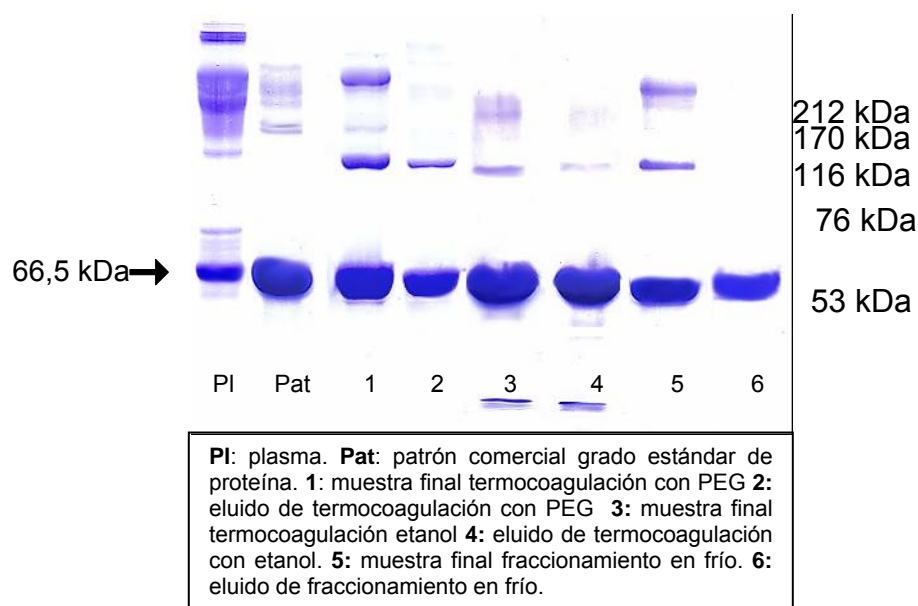


Figura 17. Electroforesis SDS - PAGE al 10% de cromatografía de intercambio iónico de muestras finales de albúmina

La figura 18 muestra los cromatogramas de una cromatografía de fase reversa realizada por HPLC. En los tres gráficos, la albúmina se encuentra en el segundo pico (señalado con una flecha), el cual presentó un tiempo de retención de alrededor de 18 minutos. En todos se observa que las muestras están relativamente puras, en comparación con el plasma (Ver cromatograma en anexo 6). Asimismo, se denota que la muestra proveniente de la termocoagulación

selectiva con etanol (B), es la más pura, e incluso se asemeja al cromatograma del patrón de albúmina comercial grado estándar de proteína que se muestra en el anexo 6. En cuanto a los otros dos cromatogramas, ambos evidencian que las muestras finales de termocoagulación con PEG y de fraccionamiento alcohólico en frío que se corrieron, aún poseen cierto grado de contaminantes, puesto que luego de que sale la albúmina se ve un incremento en el nivel de la curva.

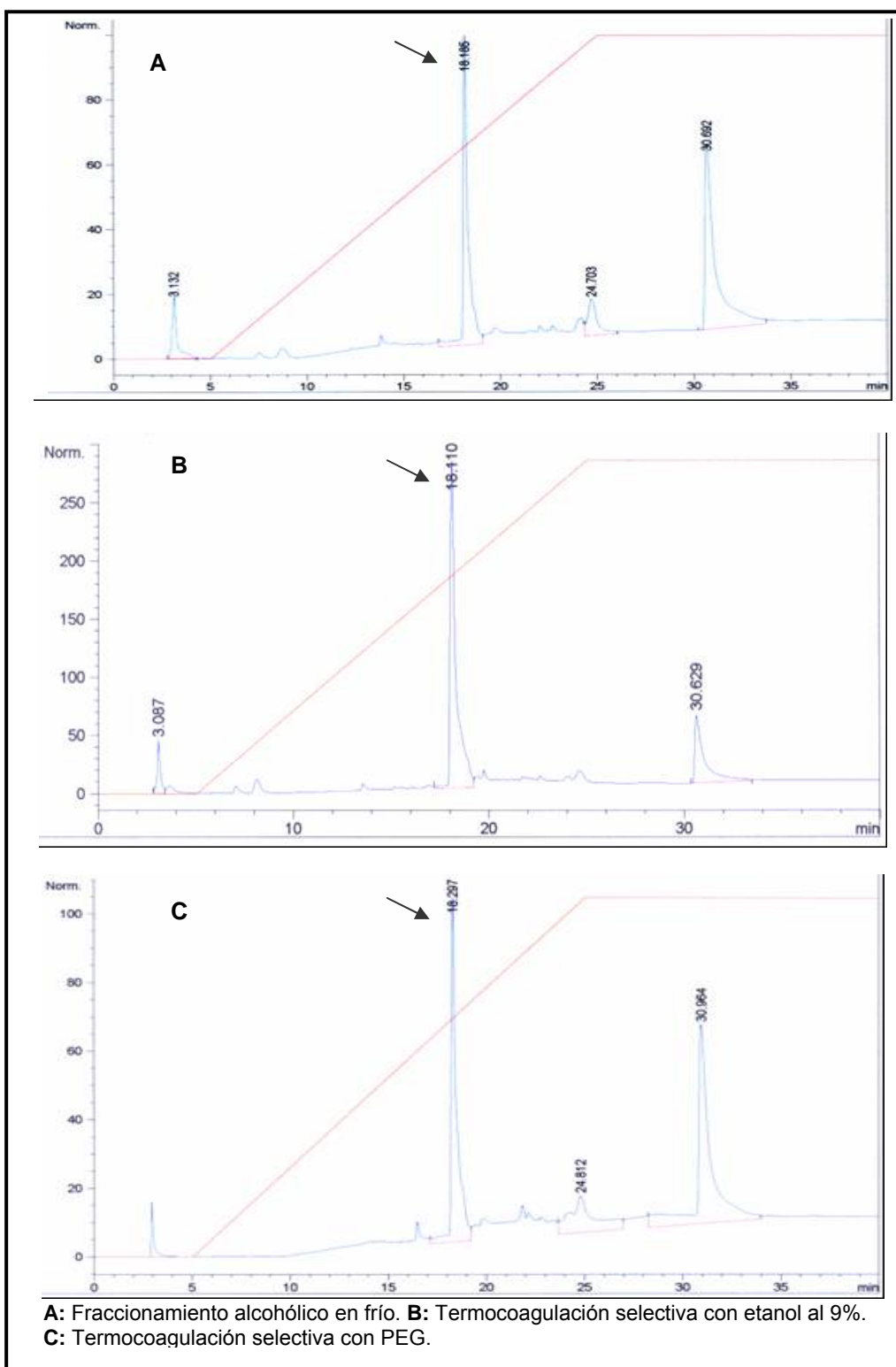


Figura 18. Cromatogramas de cromatografía de fase reversa en HPLC de muestras finales de albúmina obtenidas mediante diferentes métodos de fraccionamiento

Por último, en referencia a los resultados obtenidos en el ELISA, todas las muestras finales obtenidas mediante los métodos ensayados, presentaron niveles muy bajos de anticuerpos IgG de caballo, ya que en promedio presentaron menos del 1% de las inmunoglobulinas que presenta el suero antiofídico empleado como control.

Diseño de un procedimiento para la purificación de albúmina

La figura 17 presenta un esquema general del procedimiento que se propone para la obtención de albúmina, el cual no incluye las condiciones de cada técnica, sino la secuencia de las mismas.

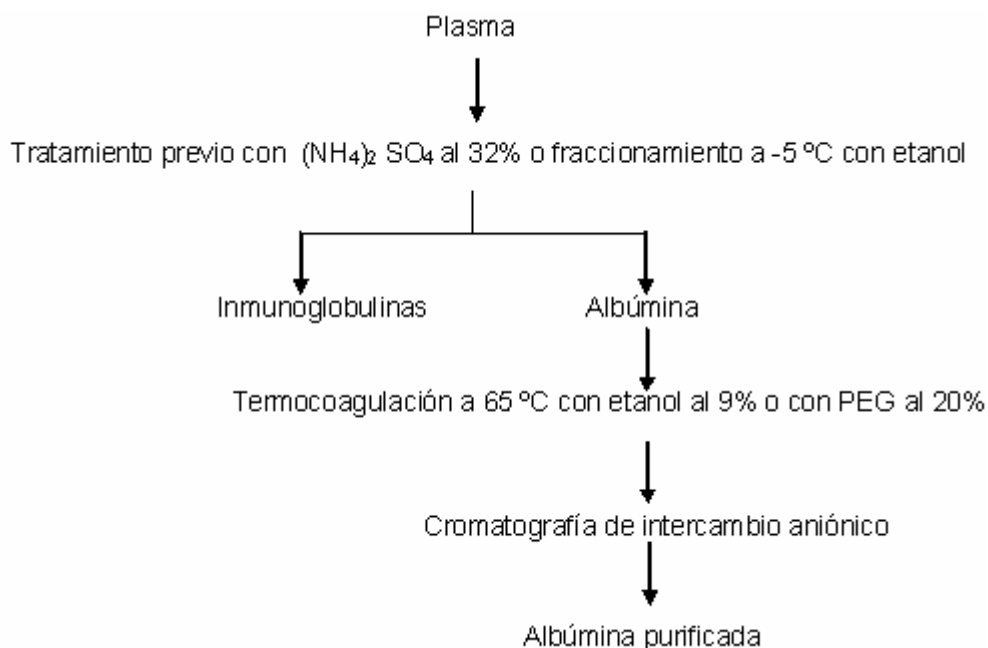


Figura 19. Esquema del proceso para la purificación de albúmina con la combinación de las técnicas evaluadas

DISCUSIÓN

Los diversos métodos de purificación de proteínas que existen, se fundamentan en las propiedades que tienen las proteínas en solución. Por lo tanto, para separar mezclas de éstas, se usa como base alguno de los siguientes criterios: el tamaño de la proteína (peso molecular), la solubilidad, la carga eléctrica y la afinidad biológica de la proteína por otras moléculas. En el presente trabajo, los métodos de purificación empleados, se basan en el criterio de la solubilidad en el caso del fraccionamiento alcohólico y la termocoagulación selectiva, y en la carga eléctrica, en el caso de la cromatografía de intercambio iónico (Matthews *et al.*, 2003).

La solubilidad de cualquier soluto depende de la afinidad o tendencia que tenga ya sea por moléculas de su misma especie, o bien por moléculas del disolvente. La solubilidad aumenta cuando se reduce el grado de interacción de las propias moléculas del soluto, en este caso las proteínas, lo que trae consigo que se produzca un mayor contacto del soluto y el disolvente (Badui, 1996).

El hecho de que no todas las proteínas reaccionan de igual forma ante un cambio en el medio donde se encuentran disueltas, es de gran utilidad durante los procesos de aislamiento y purificación de las mismas. En algunos casos, la desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional secundaria, terciaria y cuaternaria sin que exista hidrólisis de los enlaces peptídicos) conduce a la pérdida total de la solubilidad, con lo que la proteína de interés o la que se quiere eliminar precipita; como en algunos casos este fenómeno es reversible, es posible precipitar proteínas de manera selectiva (Belitz y Grosch, 1992).

La solubilidad de las proteínas está determinada por tres factores principales: su grado de hidratación, su densidad y distribución de cargas a lo largo de la cadena, y la presencia de compuestos no proteicos como fosfatos, carbohidratos o lípidos que pueden tener un efecto estabilizante. Las proteínas son electrolitos de alto peso molecular y de un gran orden estructural, por tanto son muy susceptibles a

cambios profundos en su solubilidad cuando se altera alguno de los factores anteriores. Los principales agentes que logran afectar estos son: la fuerza iónica, el pH, las propiedades del disolvente y la temperatura. La insolubilización completa de las proteínas produce su precipitación, lo que sucede cuando varias moléculas del polipéptido llegan a estar en contacto muy íntimo, de tal manera que forman grandes agregados, cuya solubilidad es menor que la de las moléculas en forma individual (Badui, 1996). Es necesario mencionar que la solubilidad de las proteínas es el resultado de la influencia en forma conjunta de los distintos factores y que no se pueden aislar fácilmente uno de otro por ejemplo, la desnaturalización por temperatura depende fuertemente del pH y viceversa. En el fraccionamiento por solventes orgánicos, el pH y fuerza iónica deben estar claramente definidos (Calvo, 2003).

Fraccionamiento alcohólico en frío

El método de fraccionamiento alcohólico en frío se basa en la solubilidad diferencial de la albúmina y otras proteínas con respecto a las propiedades del disolvente, el pH, la temperatura, la fuerza iónica y la concentración proteica (More y Harvey, 1991). En la presente investigación, se evaluaron todos estos aspectos por aparte, excepto la variable de la fuerza iónica.

En cuanto al disolvente orgánico empleado, es decir el etanol, se comprobó que logra precipitar proteínas plasmáticas, lo cual ocurre porque interactúa con el interior hidrofóbico de las proteínas y desorganiza su estructura tridimensional, provocando su desnaturalización y precipitación (González, 1998). Existen dos explicaciones sobre cómo ocurre dicha interacción, la primera y la más antigua es que el etanol posee una constante dieléctrica más baja que el agua. La constante dieléctrica es una medida de la tendencia del disolvente a oponerse a las fuerzas electrostáticas de atracción entre iones de cargas opuestas. Por lo tanto, la fuerza de atracción o interacción entre dos moléculas de proteína puede aumentar si se

colocan en un disolvente con un valor bajo de su constante dieléctrica, lo que genera que tiendan a agregarse y precipitar (Badui, 1996).

La segunda explicación proviene de estudios realizados por Van Oss (1989), quien afirma que el etanol no disminuye significativamente la constante dieléctrica del agua. Según este investigador, el etanol se asocia con el agua de manera más estrecha que lo que lo hacen las proteínas. Por lo tanto, su verdadero efecto es deshidratar la superficie de estas, las cuales luego se asocian entre sí mediante fuerzas de van der Waals. Además, la remoción de las moléculas de agua alrededor de los grupos iónicos superficiales de las moléculas proteicas, genera que la interacción entre estas sea más fuerte, en el caso de proteínas con carga opuesta en su superficie. Ambos factores provocan la agregación y posterior precipitación de las proteínas.

Por lo tanto, emplear la concentración adecuada de este disolvente es esencial, de manera que en la primera etapa del proceso, precipiten solamente las proteínas contaminantes. Con base en los resultados obtenidos, la concentración más apropiada es al 42%. Las otras dos concentraciones evaluadas, resultaron en porcentajes de pureza muy bajos, debido a que hubo una separación proteica deficiente. Al emplear una concentración menor (al 38%), probablemente muchas proteínas se mantuvieron disueltas debido a que el poder precipitante del etanol no fue el suficiente. En el caso de la concentración al 45%, pudo haber ocurrido lo contrario, y que precipitaran la mayor parte de las proteínas incluyendo la albúmina. Sin embargo, es importante mencionar que en todas las pruebas realizadas mediante esta técnica, el etanol precipitó algún porcentaje de albúmina, lo que representa una reducción del rendimiento al final.

En cuanto al factor del pH, antes de incubar la mezcla inicial, el pH se ajustó a un valor de 5,7; este valor facilita el hecho de que la albúmina se mantuviera en solución al cargarse negativamente por estar en un medio con un pH mayor a su punto isoelectrico ($pI = 4,7$). Esto se debe a que la solubilidad de las proteínas

globulares está muy influenciada por el pH al que se encuentran, ya que es mínima en su punto isoeléctrico, pero aumenta considerablemente al alejarse de él. Dependiendo del pH del sistema, las proteínas pueden actuar como cationes o como aniones, de tal manera que al tener la misma carga eléctrica desarrollan fuerzas de repulsión entre sí que repercuten en un aumento de su solubilidad y estabilidad (Badui, 1996; Matthews *et al.*, 2002).

El punto isoeléctrico es un aspecto fundamental en esta técnica, ya que es el que permite separar la albúmina de otras proteínas. Es por esto que en la mayoría de las pruebas, el sobrenadante obtenido después de la primera centrifugación, se acidifica hasta 4,7 de manera que la albúmina pueda ser recuperada en el precipitado luego de la segunda centrifugación. Dicha precipitación se da porque en el punto isoeléctrico la carga neta de la albúmina es cero, pero cada una de las moléculas de la proteína todavía tiene zonas en la superficie con carga negativa y positiva. Las interacciones carga-carga, junto con otras clases de interacciones intermoleculares como las fuerzas de van der Waals, hace que las moléculas tiendan a aglutinarse y precipitar (Matthews *et al.*, 2002). Con respecto a los resultados obtenidos al estudiar este factor, se evidenció que por lo general, la albúmina precipita en este valor de pH. No obstante, también se obtuvieron buenos resultados al bajar el pH hasta 4,4, dejando la albúmina en el sobrenadante; hecho que ocurre por la misma razón expuesta en el párrafo anterior, solo que en este caso, la albúmina está cargada positivamente. Se logró comprobar además, que el porcentaje de pureza en la muestra incrementó al dejar pasar 20 horas luego de haber bajado el pH, esto porque hubo más tiempo para que se dieran las interacciones moleculares, y que pudieran precipitar ya sea mayor cantidad de albúmina (pH 4,7) o de proteínas contaminantes (pH 4,4),

Con respecto a la temperatura, se determinó que la temperatura más adecuada es a -5 °C. A temperatura ambiente, el porcentaje de pureza fue el más bajo (57%), esto se debe a que el etanol puede desnaturalizar las proteínas, especialmente cuando se emplea en altas concentraciones, por tanto este método se debería

realizar a bajas temperaturas (entre -3 y -7°C) (Schneider *et al.*, 1979). En el caso de las pruebas llevadas a cabo a 4 °C y a -10°C, se obtuvieron mejores resultados; si se optimizara la metodología de cada una podrían obtenerse porcentajes de pureza y rendimiento mayores, sobre todo en el caso de la temperatura a -10 °C, con la que se obtuvo casi un 80% de pureza.

Por último, con respecto al porcentaje inicial de proteínas, a diferencia del método propuesto por Hao (1979b), en el cual propone un porcentaje del 1,2%, se estableció que se obtienen mejores resultados, con una concentración proteica más alta (al 1,7%), hecho que concuerda con el método original planteado por Cohn, en el que la etapa de recuperación de albúmina se hace a 2,5% de proteínas.

El valor más alto de rendimiento de recuperación de albúmina se obtuvo con el método que emplea etanol al 42%, una temperatura de -5 °C y un ajuste de pH a 4,7. Dicho valor corresponde a un 58%, el cual se aproxima al reportado por el método de Cohn que, por lo general presenta un rendimiento del 60-70%. Sin embargo la pureza de este método fue del 85%, dicho porcentaje fue superado cuando se realizó la metodología con etanol al 42%, a -5 °C, pero con un ajuste de pH al 4,4 y dejando pasar 20 horas antes de centrifugar, con el cual se obtuvo una pureza del 96%, que concuerda con el método de Cohn, el cual presenta una pureza del 95% (Matejtschuk *et al.*, 2000). En general, la concentración final de proteínas en todas las muestras fue muy bajo (menos de 10 g/L), hecho que difiere con el rendimiento obtenido por Cohn que es de 22 a 23 g/L (Hao, 1979a).

Termocoagulación selectiva

Al calentar una mezcla de proteínas, la energía cinética de las moléculas aumenta, con lo que se desorganiza la envoltura acuosa y la estructura de las proteínas, así como las interacciones en las que estas participan, de manera que el interior hidrofóbico interacciona con el medio acuoso y se produce la agregación y precipitación de la proteína desnaturalizada (González, 1998). Por lo tanto, el

proceso de calentamiento a temperaturas entre 60 y 70 °C, se hace con el objetivo de desnaturalizar proteínas plasmáticas no deseadas, y dejar la albúmina en suspensión, puesto que esta soporta temperaturas de hasta 70 °C, especialmente en presencia de un agente estabilizante.

Edsall (1984) menciona que la presencia de pequeños iones orgánicos en las preparaciones de albúmina, favorece su estabilidad térmica. Dentro de estos iones, el que tiene mayor capacidad estabilizante es el caprilato de sodio, seguido por el propionato y por último el acetato. El caprilato de sodio es un ácido graso de cadena larga ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COONa}$) que se une con elevada afinidad a sitios específicos de la molécula de albúmina, lo que mejora la estabilidad de esta molécula y la protege de la desnaturalización por efecto del calor y condiciones de pH extremos (Orfani, 1999). Moya *et al.* (2000) expresan que dicha afinidad se da como resultado de la atracción de diferentes grupos de la molécula de albúmina por las porciones polares y no polares de los aniones de ácidos grasos.

Etanol

Inicialmente, se empleó una metodología muy similar a la aplicada en el caso del fraccionamiento alcohólico en frío, con la diferencia de que llevaba un paso inicial de calentamiento del plasma. Luego del calentamiento, se adicionó etanol al 42% para precipitar aquellas proteínas contaminantes que se hayan desnaturalizado. Esta metodología dio un porcentaje de pureza de 72%, pero su inconveniente, fue que todas las pruebas que se llevaron a cabo produjeron muestras finales con una concentración extremadamente baja de proteínas, hecho que incide directamente sobre el rendimiento de la prueba. Esto pudo haberse dado porque la concentración de etanol era alta y al precipitar las proteínas desnaturalizadas, también desestabilizó a gran parte de la albúmina, precipitándola. Asimismo, ya que este precipitado fue descartado luego de la primera centrifugación, el sobrenadante que se recuperó para seguir con el proceso, tenía una concentración baja de proteínas. Al respecto, Schneider (1979) y Moya *et al.*

(2000), proponen emplear concentraciones mucho más bajas de etanol, al 9% en el primer caso y al 5% en el segundo.

Es por esto que como base de la termocoagulación selectiva con etanol se empleó la metodología propuesta por Schneider (1979) con algunas modificaciones. Dicha metodología resultó en porcentajes de pureza mucho más altos (de 94%) y con una concentración de albúmina promedio de 18,8 g/L, la cual concuerda con Orfani (1999) que obtuvo 16,8 g/L. Además, el proceso dura menos tiempo ya que el tiempo de calentamiento es de 30 minutos y sólo ocupa de una centrifugación. La albúmina se recuperó en el sobrenadante, lo que facilita los pasos siguientes relacionados con la formulación del producto. Sin embargo, esta situación también representa una desventaja debido a que el volumen de sobrenadante que se recupera es bajo, por lo que en general el porcentaje de rendimiento de albúmina es aproximadamente del 30%.

El mayor inconveniente que se presentó con esta metodología fue la formación de una estructura sólida luego del proceso de calentamiento, que dificultó la acidificación de la mezcla para separar la albúmina. Esto ocurre porque las proteínas interaccionan fuerte e irreversiblemente después de su desnaturalización a través de una serie de reacciones complejas conocidas como coagulación, gelificación o floculación. Este proceso ocurre en dos etapas, primero se da un desdoblamiento y desnaturalización de las proteínas, que en una segunda reacción se asocian gradualmente para producir una red tridimensional de moléculas que retiene gran cantidad de agua, lo que resulta en la formación del coágulo o gel (Badui, 1996; Belitz y Grosch, 1992).

Lo anterior coincide con lo afirmado por Marcelino y Guidolin (1991), de que en experiencias realizadas con termocoagulación siguiendo exactamente la técnica de Schneider, se verificó una gran dificultad al filtrar la albúmina en este punto de la metodología, hecho que también fue reportado por el mismo Schneider.

Es por esto que se implementaron varias estrategias con tal de disminuir la formación del coágulo, como lo son la dilución inicial del plasma con agua destilada y la agitación durante el proceso de calentamiento. En ambos casos, no se dio formación del coágulo, sin embargo, el porcentaje de pureza disminuyó. En cuanto al porcentaje de recuperación de albúmina, al diluir el plasma, se obtuvo un mayor porcentaje (34%) debido a que se generó mayor cantidad de sobrenadante. Lo contrario ocurrió al agitar el plasma, pues dicho porcentaje fue muy bajo. Orfani (1999) afirma que es indispensable agitar durante este proceso, por lo que se considera necesario optimizar las condiciones bajo las cuales se realiza la agitación, de manera que este paso pueda incorporarse adecuadamente a la metodología que se utilizó en el presente trabajo.

Otras pruebas que produjeron resultados útiles, fueron emplear plasma normal como materia prima y esperar 20 horas luego de bajar el pH y antes de centrifugar. En el primer caso, se presentó la concentración de albúmina promedio más alta de los ensayos efectuados en este trabajo (22 g/L) y con una pureza de 94%. Esto probablemente se debe a que el plasma hiperinmune posee un porcentaje más alto de inmunoglobulinas y más bajo de albúmina con respecto al que se encuentra en un plasma normal, es decir, que en este hay más albúmina que se pueda purificar.

En el caso de la otra prueba, se obtuvo que al esperar 20 horas luego de bajar el pH, la coagulación del plasma disminuye y que al centrifugar, se obtiene un sobrenadante mayor que en los otros casos (35 ml por cada 50 ml de plasma), hecho que concuerda con los resultados obtenidos con el fraccionamiento en frío. Por lo tanto, dicho paso debería considerarse dentro de un proceso de fraccionamiento para la obtención de albúmina.

Con respecto al uso del sulfato de amonio como tratamiento previo del plasma, se demostró su capacidad como agente precipitante de proteínas. Dicha precipitación se dio porque la presencia de esta sal aumentó considerablemente la fuerza iónica

del sistema, lo que provocó una disminución en el grado de hidratación de los grupos iónicos superficiales de las proteínas, ya que esta sal compite por el agua y rompe los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas entre las proteínas y el agua, de manera que las moléculas proteicas se agregan y precipitan; a este proceso se le conoce como insolubilización por salado o "salting out" (González, 1998; Badui, 1996; Matthews *et al.*, 2002). El hecho de que el proceso de termocoagulación se llevó a cabo a partir de una muestra con menor contenido proteico, generó que luego de calentar, no se formara el coágulo, que por lo general se forma al realizar esta técnica y que dificulta el proceso. Otra ventaja de este paso previo es que este tipo de precipitación permite recuperar las inmunoglobulinas del plasma, para su posterior procesamiento. Esto se debe a que en muchos casos, la precipitación provocada por el aumento de la fuerza iónica es reversible y mediante una diálisis se puede eliminar el exceso de soluto y recuperar tanto la estructura como la función original de las inmunoglobulinas (González, 1998).

Polietilenglicol (PEG)

El PEG es un polímero sintético muy soluble en agua, que posee características muy ventajosas: no provoca reacción exotérmica cuando interactúa con una solución, la precipitación ocurre muy rápido a diferencia con el etanol, y la centrifugación se realiza inmediatamente, por lo que se reduce el riesgo de contaminación y degradación proteica (Curling, 1983).

Los resultados obtenidos al emplear PEG como agente precipitante de las proteínas desnaturalizadas por el calor, fueron buenos. Se cree que dicha precipitación se da como producto de un proceso de exclusión en el cual las interacciones de las proteínas con el solvente, son reemplazadas por las que se generan entre las redes del polímero y el solvente, es decir, similar al caso del etanol y el sulfato de amonio, el PEG compite con las proteínas por el agua (Curling, 1983)

El porcentaje de rendimiento en la recuperación de albúmina fue el más alto entre las metodologías evaluadas (alrededor del 60%) y el porcentaje de pureza de las muestras finales estuvo entre 90 y 95%. Esto se debe a que el polietilenglicol a una concentración del 20%, precipita eficientemente las proteínas plasmáticas de manera selectiva. Incluso, se observó que el sobrenadante generado luego de la primera centrifugación, es bastante puro y por tanto, habría que considerar si es necesario bajar el pH del mismo para precipitar la albúmina, puesto que es ventajoso que la misma se recupere en el sobrenadante y porque el proceso duraría menos tiempo. Un factor que pudo contribuir a que la metodología fuera más eficiente fue la adición del EDTA que tiene una interacción positiva en presencia del PEG, ya que reduce la estabilidad de la transferina (al romper el complejo transferina-hierro) y otras metaloproteínas, generándoles cambios conformacionales que facilitan su precipitación por parte del PEG, generando que la muestra quede más pura (Hao, 1979a).

A pesar de haberse obtenido resultados satisfactorios, no se logró igualar el valor de la concentración proteica obtenida en las muestras finales (alrededor de 10 g/L), con los valores reportados por Hao (1979a), quien afirma que empleando este método, obtuvo un rendimiento de 28,5 g/L de albúmina a partir de 55 litros de plasma. No obstante, habría que evaluar la técnica partiendo de una mayor cantidad de plasma para que los valores puedan compararse realmente.

Asimismo, se demostró que el paso del calentamiento es muy importante para que la técnica sea eficiente, ya que al realizar pruebas a temperatura ambiente los resultados fueron comparativamente más bajos.

Cromatografía de intercambio iónico

Se llevaron a cabo cromatografías de intercambio aniónico, con membranas porosas recubiertas con amonio cuaternario, es decir que al pasar una muestra por las mismas, aquellas partículas cargadas negativamente, interactúan con la

membrana. Al pH en que se realizaron las pruebas, el cual corresponde al pH fisiológico del plasma (alrededor de 7), la albúmina se carga negativamente (More y Harvey, 1991). Por esta razón, en los cromatogramas de las corridas, la albúmina correspondió al segundo pico (figura 15), ya que el primer pico, corresponde a las proteínas cargadas positivamente que no interactuaron con el la membrana, y ese segundo pico, se produjo al eluir la albúmina con NaCl, ya que los iones Cl^- interactúan con la membrana y desplazan a la albúmina.

Los resultados obtenidos al pasar plasma por las membranas fueron muy bajos en cuanto a pureza y rendimiento. Dichos resultados se deben a que, tal como lo mencionan More y Harvey (1991), al purificar albúmina empleando solamente técnicas cromatográficas, el plasma siempre se somete a un proceso de pre-tratamiento como por ejemplo filtración, centrifugación o filtración en gel con el fin de eliminar lípidos, fibrinógeno, euglobina, entre otros. Además, luego de dicho pre-tratamiento, por lo general se emplean dos pasos cromatográficos, primero se pasa el plasma tratado por una columna de intercambio aniónico, y luego por una de intercambio catiónico.

En referencia con las otras pruebas de intercambio iónico realizadas, la cromatografía se empleó como un paso final de purificación de las muestras provenientes de los procesos de fraccionamiento ya descritos, el cual funcionó, puesto que el nivel de pureza de las mismas incrementó. Debido a que este procedimiento aumenta la calidad del producto, se emplea en muchos lugares, por ejemplo una empresa dedicada a la producción de hemoderivados ubicada en Inglaterra, emplea la cromatografía para refinar la pureza de su producto (obtenido mediante el método de Kistler y Nitschmann) con el fin de reducir concentraciones de proteínas contaminantes y de endotoxinas. Además, el producto final tiene una pureza $\geq 99\%$ y con una concentración de monómeros $>95\%$ (Matejtschuk *et al.*, 2000).

En general, esta técnica posee muchas ventajas ya que el proceso es fácil de automatizar, potencialmente menos dañino para las proteínas y genera menor cantidad de agregados. El rendimiento de recuperación de albúmina es generalmente mayor que en el caso del método de Cohn (80-85% de rendimiento con una pureza >98%). Sin embargo, a pesar de estas ventajas, la purificación de albúmina mediante cromatografía, aún no ha sido adoptada por la limitación de que se ocupa un gran equipo cromatográfico para satisfacer la alta demanda del producto (Matejtschuk *et al.*, 2000). Es por esto, que emplearla como una etapa final, resulta efectivo, pero menos costoso.

Por otra parte, con respecto a los resultados del ELISA de todas las muestras finales de los diferentes procesos de purificación de albúmina evaluados, se puede afirmar que las proteínas contaminantes que no fueron eliminadas durante dichos procesos, no son inmunoglobulinas IgG contra el veneno de serpiente. Estos datos concuerdan con los resultados de la cromatografía en fase reversa en HPLC, que generó cromatogramas donde no se denota una presencia clara de dichas proteínas.

Diseño de un procedimiento para la purificación de albúmina

Con el fin de cumplir con el cuarto objetivo de la presente investigación, se propone un procedimiento para la purificación de albúmina (figura 19) basado en los resultados obtenidos. En el mismo, no se incluyeron las condiciones específicas bajo las cuales se debe dar cada etapa. Como primer paso, se propone realizar un tratamiento previo del plasma de manera que se pueda separar no solo la albúmina, sino también las inmunoglobulinas. Entre las técnicas evaluadas, la precipitación con sulfato de amonio y el fraccionamiento alcohólico en frío, producen un grado de desnaturalización reversible en las inmunoglobulinas, hecho que no ocurre en el caso de la termocoagulación. Otra razón por la que este paso es importante es que la presencia de proteínas contaminantes se reduce, por lo que los pasos siguientes de purificación de ambas proteínas, se facilitarían. Basándose en los resultados obtenidos en este

trabajo, se considera que esta etapa, se lograría con mayor eficiencia empleando la precipitación con sulfato de amonio. No obstante, si se logran optimizar las condiciones del fraccionamiento alcohólico, se podrían obtener resultados muy favorables; sin embargo, se debe tomar en cuenta que esta técnica se lleva a cabo a temperaturas bajo cero, por lo que puede resultar más costosa.

Producto de los resultados obtenidos, se plantea la termocoagulación como el paso fundamental para purificar la albúmina de otras proteínas plasmáticas, ya que en el proceso de calentamiento, la gran mayoría de las proteínas contaminantes se desnaturaliza irreversiblemente, excepto la albúmina, por ser más estable a temperaturas de hasta 70 °C, lo que genera porcentajes de pureza más altos. Al respecto, Budnick y Fitzgerald (2003) afirman que el uso del método de termocoagulación permite alcanzar un mayor grado de pureza en comparación con la técnica de fraccionamiento alcohólico en frío, ya que el contenido típico de residuos de ácidos grasos de la albúmina obtenida mediante fraccionamiento de Cohn, es mucho mayor que el que existe en la albúmina obtenida por termocoagulación.

Como tercera etapa dentro de este proceso de purificación, se propone realizar una cromatografía de intercambio iónico que aumente la calidad de las muestras, al aumentar la pureza y reducir niveles de agregados, endotoxinas, aluminio y PKA (activador de la precalicreína), entre otros.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye lo siguiente:

- Al llevar a cabo las diferentes técnicas de purificación de albúmina, en todos los casos, se logró obtener algún grado de pureza en las muestras finales.
- El método de purificación de albúmina más eficiente fue la termocoagulación selectiva con PEG al 20%, en el cual se obtuvo un nivel de pureza del 95% y un rendimiento de recuperación de albúmina del 60%.
- Con respecto al fraccionamiento alcohólico en frío, los mejores resultados se lograron al emplear una concentración de etanol al 42%, con una concentración proteica inicial del 1,7%, una incubación de -5 °C, con la precipitación isoeléctrica a un valor de pH del 4,7 y dejando pasar 20 horas luego de bajar el pH y antes de centrifugar por segunda vez.
- Las condiciones bajo las cuales se generan los mejores resultados al implementar la termocoagulación selectiva con etanol son: concentración de etanol al 9%, calentamiento a 65 °C por 30 minutos con agitación, ajuste de pH a 4,4 y dejar pasar 20 horas luego de bajar el pH y antes de centrifugar.
- El método con el que se obtuvo mayor concentración de proteínas en las muestras finales, fue con el de termocoagulación con etanol (20 g/L); y el método con el que se obtuvieron los valores más bajos fue el de fraccionamiento alcohólico en frío.
- La cromatografía de intercambio aniónico tiene la capacidad de incrementar los niveles de pureza de las muestras obtenidas por los otros métodos de purificación.

- El método de verde de bromocresol no es el más adecuado para la cuantificación de albúmina, principalmente cuando esta se encuentra en bajas concentraciones.

RECOMENDACIONES

A continuación se presentan las recomendaciones al presente trabajo:

- Llevar a cabo pruebas con mayor cantidad de plasma, para evaluar la escalabilidad de las técnicas utilizadas en esta investigación.
- Realizar pruebas con plasma humano para verificar la eficiencia de las técnicas empleadas al purificar albúmina humana.
- Establecer las condiciones óptimas para separar la albúmina y las inmunoglobulinas del plasma, de manera que cada una pueda someterse a procesos posteriores de purificación
- Contemplar las especificaciones requeridas para comercializar la albúmina tanto a nivel terapéutico como grado reactivo, dentro del proceso de obtención de la misma.
- Incorporar en el proceso de elaboración pasos que contribuyan a la seguridad viral del producto y evaluar su efectividad.
- Formular el producto una vez que se obtenga albúmina con los niveles de pureza y rendimiento adecuados.
- Validar un método de cuantificación de albúmina por HPLC, por ejemplo basado en cromatografía de fase reversa, que genere resultados más precisos y reproducibles.

BIBLIOGRAFIA

- Andonegi, G. 2006. Albúmina humana a partir de plantas de tabaco. Fundación Elhuyar. <<<http://www.eurekalert.org/staticrel.php?view=ef0324>>> (Enero, 2006)
- Argüelles T.; Callaba R.; Barth R.; Schöller, C. 2004. Procedimientos para la extracción de las peptidasas vegetales. Laboratorio de Investigación de Química Forestal. Universidad Nacional de Misiones. Argentina. <http://agr.unne.edu.ar/Extension/Res2004/Biotecnologia/Biotec-004.pdf> (Diciembre, 2005)
- Badui, S. 1996 Química de los alimentos. 3 ed. México D.F, Editorial Alambra. 430 p.
- Emerson, T.E., 1989. Unique features of albumin: A brief review. Crit Care Med, 49: 74-79
- Belitz, H.D. y Grosch, W. 1992. Química de los alimentos. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 1067 p.
- Budnick, M.; Fitzgerald, R. 2003. New life for a diagnostic reagent mainstay. In Vitro Diagnostic: developing and manufacturing. Medical Device Link <<<http://www.devicelink.com/ivdt/archive/03/06/009.html>>>. (Mayo, 2006).
- Burnouf, T. 1995. Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends. Journal of Chromatography B: Biomedical applications, 664: 3-15
- Calvo, J.C. 2003. Precipitación selectiva de las proteínas. Departamento de Química Biológica. Universidad de Buenos Aires <<<http://www.qb.fcen.uba.ar/quimicabiologica/>>> (Julio, 2006).

- Curling, J.M. 1983. Current practice and future possibilities in plasma protein fractionation. En: Separation of Plasma Protein. Academic Press. London, England. 326p.
- Daniell, H. 2003. Production of human serum albumin in transgenic crops without interfering with food or feed production. Molecular Biology and Microbiology Department. Center Florida University. <<<http://www.nbiap.vt.edu/articles/sep0304.htm>>> (Febrero, 2006).
- Edsall, J. 1984. Stabilisation of serum albumin to heat and inactivation of the Hepatitis virus. Vox sanguinis, 46: 338-340
- Estrada, R. 2006. Entrevista personal. Veterinario del Instituto Clodomiro Picado.
- Fernández, A.; Mingo, A.; Miller M.; Daniell, H. 2003. A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify human serum albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. Plant Biotechnology Journal, 1: 71-79.
- González, J.M. 1998. Curso de biomoléculas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad del País Vasco. <<<http://www.ehu.es/biomoleculas/PROT/PROT2.htm>>> (Julio, 2006).
- Hao, Y. 1979a. Preparation of albumin using PEG and EDTA. Patente de Estados Unidos n° 4,164,496. <<<http://www.freepatentsonline.com/4164496.html>>>. (Enero, 2006).
- Hao, Y. 1979b. A simple method for the preparation of human serum albumin. Vox Sanguinis, 36: 313-320.
- Hao, Y.; Ingham, K.C.; Wickerhauser, M. 1980. Fractional precipitation of proteins with polyethylene glycol. En: Separation of Plasma Protein. Academic Press. Londres, Inglaterra. 326p.

- Heinrich, K.; Thömmes, J.; Kula, M.R. 1996. Plasma protein fractionation with advanced membrana adsorbers. *Biotechnology and Bioengineering*, 54(2):181-189.
- Human Protein Reference Database (HPRD). 2006. Albumin. Johns Hopkins University and Institute of Bioinformatics. <<<http://www.hprd.org/protein/00062>>>. (Mayo, 2006)
- Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). 2005. Quimbiotec: Hemoderivados. Planta productora de derivados sanguíneos. <<<http://www.quimbiotec.com/?mod=hemoder.htm>>>. (Diciembre, 2005).
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudarai, P.; Kaiser, C.; Krieger, M.; Scott, M.; Zipursky, L. 2003. *Molecular Cell Biology*. Fifth edition. W.H. Freeman. New York. USA.
- Lomonte, B. 1998. *Inmunología General. Manual de Laboratorio*. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 91 p.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 1999. *Brock: Biología de los microorganismos*. Octava edición. Prentice Hall. Madrid, España. 1064 p.
- Madriz, K. 2005. *Manual de Laboratorio de Biología Molecular*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Editorial Tecnológica, Cartago. pp. 41-45.
- Marcelino, J.R. y Guidolin, R. 1991. Preparação de soro albumina eqüina por fracionamento sulfato de amônio – etanol – calor. *Instituto Butantan. Bol. Biotecnol*, 2: 15 - 17.

- Matejtschuk, P., Dash, C.H., Gascoigne, W. 2000. Production of human albumin solution: a continually developing colloid. *British Journal of Aenesthesia*, 85 (6): 887 – 895.
- Mathews, C.K.; Van Holde, K.E.; Ahern, K.G. 2002. *Bioquímica*. 3 ed. Madrid, España. McGraw-Hill Interamericana. 1283 p.
- Minghetti, P. P.; Ruffner, D. E.; Kuang, W.-J.; Dennison, O. E.; Hawkins, J. W.; Beattie, W. G.; Dugaiczky, A. 1986. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 6747-6757.
- Moya, A., Orfani, P., Lázaro, J., Gutiérrez, E., Rodríguez, Z. y Cádiz, A. 2000. Estabilización de la albúmina con caprilato de sodio durante su obtención y pasteurización. *Vacci Monitor*, 9(4): pp. 10 – 15.
- More, J.E. y Harvey, M.J. 1991. Purification technologies for human plasma albumin. En: *Blood separation and plasma fractionation*. Editorial Wiley-Liss. New York, USA. 497 p.
- Negligan, Patrick. 2001 Albumin and critical care. *Critical Care Medicine Tutorials*. University of Pennsylvania. <<<http://www.ccmtutorials.com/misc/albumin/index.htm>>> (Junio, 2006).
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). 2006. Albumin. Johns Hopkins University. <<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=103600>>> (Mayo, 2006).
- Orfani, P. 1999. Obtención de albúmina por un método de termocoagulación selectiva para uso como reactivo. Trabajo de diploma, Universidad de la Habana, Cuba. 77 p.

- Reina, M. 2003. Métodos de Biología Celular: ELISA. Universidad de Barcelona
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm> (Mayo, 2006).
- Rojas, G.; Jiménez, J.M.; Gutiérrez, J.M. 1994. Caprylic acid fractionation of hiperimmune horse plasma: description of a simple procedure for antivenom production. *Toxicon*, 32 (2): 351 – 363.
- Romero, A. 2002. Cromatografía. Instituto de Biotecnología, UNAM. México. Disponible en <<<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>>> (Diciembre, 2005).
- Schneider, W., Frölich, C., Fiedler, H., Lefevre, H. 1979. Process for isolating albumin from blood. Patente de Estados Unidos n° 4,156,681. <<<http://www.freepatentsonline.com/4164496.html>>>. (Enero, 2006).
- Schosinsky, K., Chaves, A., Jiménez, M., Holst, I., Vargas, M., Quintana, E., Brilla, E. 1997. Manual de técnicas de laboratorio en química clínica. 10° edición. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 253 p.
- Sociedad para el Avance del Pensamiento Crítico (SARP). 2002. Logran que patatas transgénicas produzcan albúmina humana. *El escéptico digital*. <<<http://digital.el-esceptico.org/leer.php?id=127&autor=12&tema=21>>> (Mayo, 2006).
- University of Maryland Medical Center. 2004. Albúmina. <<http://www.umm.edu/esp_ency/article/003480.htm>>. (Diciembre, 2005).
- Van Oss, C.J. 1989. On the mechanism of the cold ethanol precipitation method of plasma protein fractionation. *Journal Protein Chemistry*, 8(5):661-668.
- Wikipedia, 2006. Método de Biuret. Wikipedia Foundation, Inc. <<<http://es.wikipedia.org/wiki/Biuret>>>

ANEXOS

Anexo 1.

Determinación de cloruros con nitrato de plata:

En un erlenmeyer de 250 ml, se añade lo siguiente:

- 5 ml de la muestra + 5 ml de agua
- 10 ml de ácido acético glacial, 75 ml de metanol y 0,5 ml de eosina YTS

Se mezcla y se titula con una solución volumétrica de nitrato de plata (AgNO_3) 0,1 N hasta que el cloruro de plata floccule (precipite) y la mezcla se torne rosada.

Finalmente, se aplica la siguiente fórmula para conocer el porcentaje de NaCl presente en la muestra:

$$\% \text{NaCl} = \text{ml} \times \text{N} \times 1,1688$$

donde ml = cantidad de ml de nitrato de plata empleados en la titulación

N = normalidad

Anexo 2.

Preparación del reactivo de Biuret

Pesar 3,0017 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y disolver en 500 ml de agua destilada, posteriormente pesar y añadir 9,0003 g de tartrato de sodio – calcio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y 5 g de ioduro de potasio (KI). Disolver y agregar 100 ml de hidróxido de sodio 6 M (NaOH). Aforar a un litro con agua destilada. Proteger de la luz.

La absorbancia de la mezcla final a 540 nm debe encontrarse entre 0,095 y 0,105.

Preparación del reactivo de Verde de Bromocresol

- Solución de reserva de Verde de Bromocresol:

Disolver 419 mg de verde de bromocresol en 20 ml de NaOH 0,1 M. Aforar con agua destilada hasta un litro con agua destilada. (Estabilidad aproximadamente de 15 días).

- Solución de ácido succínico pH 3,8 (,1M):

Disolver 11,8 g de ácido succínico y 100 mg de azida de sodio en 900 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 3,8 y aforar hasta un litro con agua destilada.

- Solución de trabajo de Verde de Bromocresol pH 3,8 (0,12 M):

Mezclar 200 ml de solución de reserva de Verde de Bromocresol con 800 ml de solución de ácido succínico. Agregar 2,5 ml de Brij 35 al 30% p/v. (Estabilidad por un período no menor de un año).

Anexo 3.

Preparación de soluciones para electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE) y cantidades requeridas de las mismas

- Solución de monómeros de acrilamida:

Pesar 29,2 g de acrilamida y 0,8 g de bis-acrilamida. Disolverlos en agua desionizada y aforar a 100 ml. Filtrar y guardar en refrigeración en botella ámbar de vidrio. (Vida útil menos de 1 mes).

- Amortiguador del gel separador (inferior):

Pesar 18,15 g de Tris y disolver en aproximadamente 60 ml de agua. Ajustar el pH a 8,8. Aforar 100 ml y guardar en refrigeración.

- Amortiguador del gel compactador (superior):

Pesar 3 g de Tris y disolver en aproximadamente 60 ml de agua. Ajustar el pH a 6,8. Aforar 100 ml y guardar en refrigeración.

- Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10X):

Pesar 12 g de Tris, 57,6 g de glicina y 4 g de SDS. Disolverlos en 300 ml de agua. EL pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas. Aforar a 400 ml. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces en el momento de utilizar

- Persulfato de amonio:

Preparar una solución al 10% de persulfato de amonio, alicuotar y congelar.

- Solución de SDS:

Pesar 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) y disolver en 10 ml de agua. Guardar en una botella de vidrio a temperatura ambiente

- Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2X):

Mezclar 10 ml de amortiguador del gel superior, 16 ml de solución SDS, 50 mg de azul de bromofenol, 12 ml de glicerol, 4 ml de agua. Guardar a temperatura ambiente (Vida útil menos de dos meses)

- Colorante Comassie Blue R-250:

Disolver 0,25 g de Comassie Blue R-250 en 225 ml de metanol, añadir 46 ml de ácido acético y 230 ml de agua. Mezclar durante 15 minutos, filtrar y guardar a temperatura ambiente.

- Decolorador:

Mezclar 200 ml de metanol, 100 ml de etanol, 50 ml de ácido acético y 650 ml de agua. Guardar a temperatura ambiente

- Fijador:

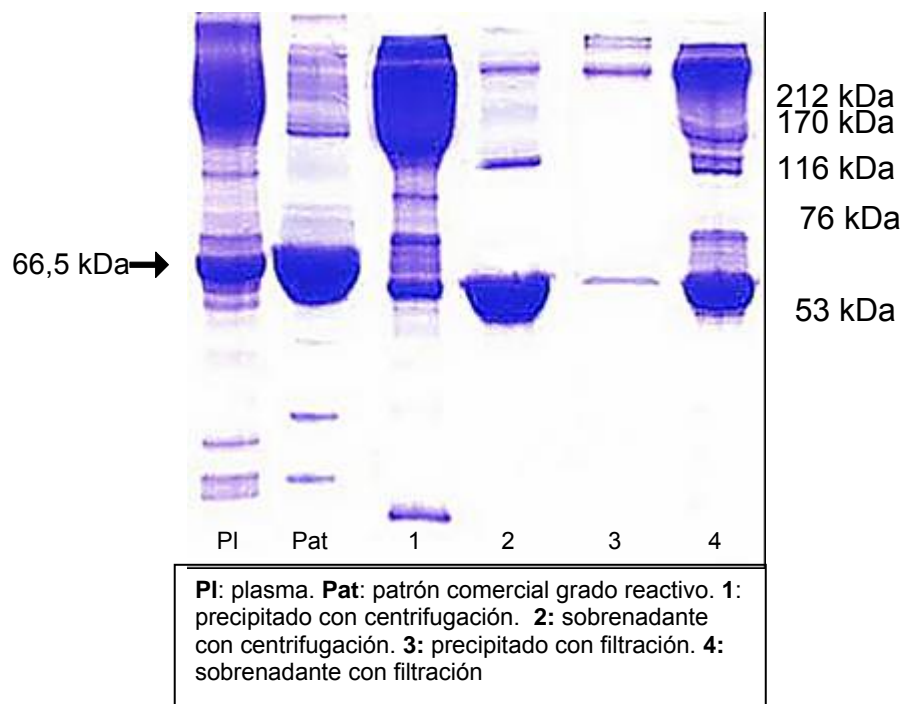
Mezclar 500 ml de metanol, 70 ml de ácido acético glacial en 430 ml de agua destilada. Guardar a temperatura ambiente en un recipiente hermético.

Cantidades de reactivos empleados en la preparación de un gel de poliacrilamida al 10%:

Reactivo	Gel separador (inferior) (μ l)	Gel compactador (superior) (μ l)
Agua	1714,3	642,8
Amortiguador separador	1071,4	-
Amortiguador compactador	-	237,5
SDS	42,8	12,5
Acrilamida	1428,6	125
TEMED	2,1	0,8
Persulfato de amonio	17,2	3,8

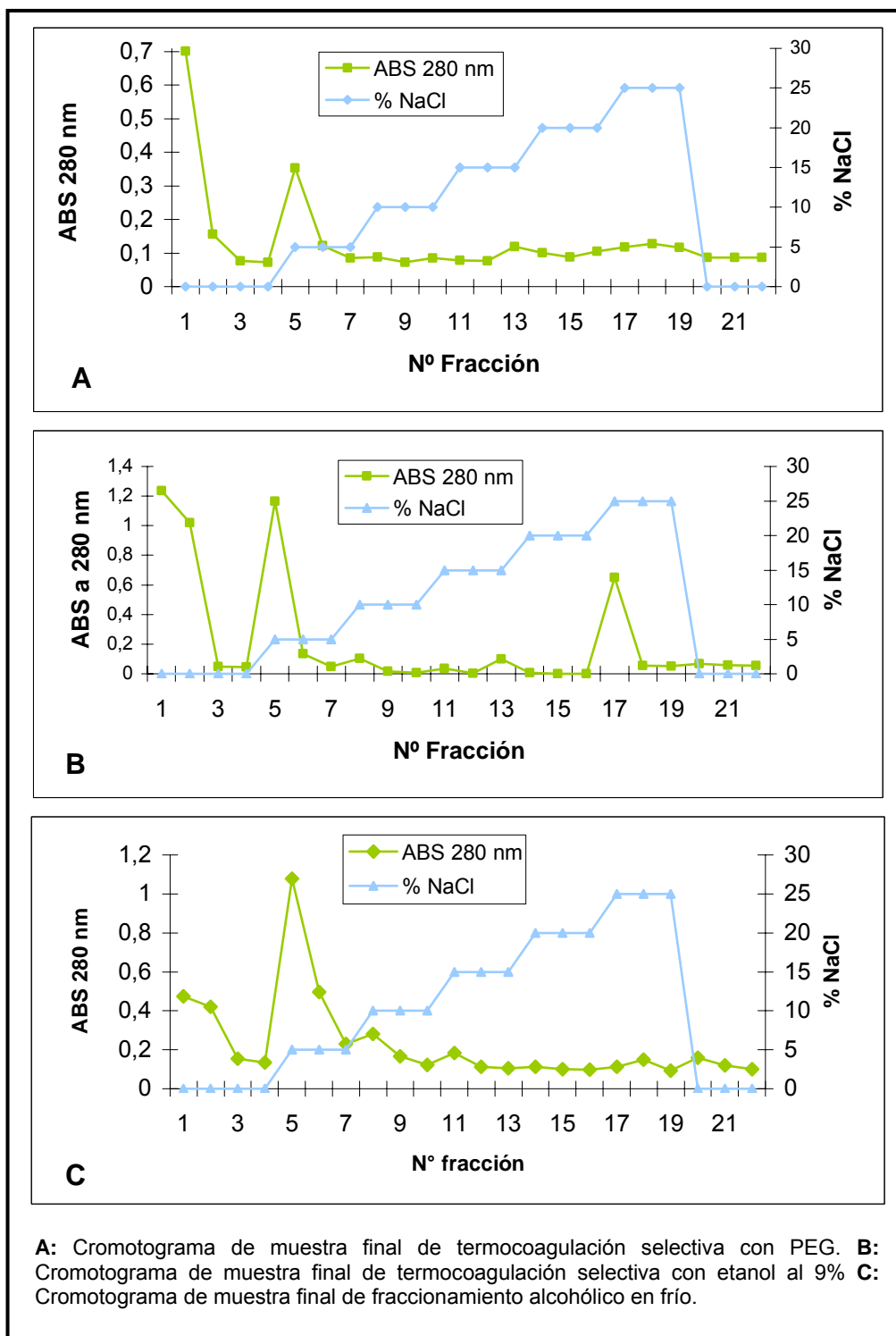
Anexo 4.

Electroforesis SDS - PAGE al 10% de muestras finales de albúmina obtenidas mediante fraccionamiento alcohólico en frío mediante centrifugación y filtración



Anexo 5.

Cromatogramas de la absorbancia a 280 nm de cromatografía de intercambio aniónico de muestras finales de albúmina obtenidas mediante diferentes métodos de fraccionamiento



Anexo 6.

Cromatogramas de cromatografía de fase reversa en HPLC de plasma y productos comerciales de albúmina

